

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**

**Diversidade genética da população
parasitária de *Leishmania* em Portugal**

Sofia Júdice da Costa Cortes

Lisboa, 2008

Dissertação de Candidatura ao Grau de Doutor no Ramo das Ciências Biomédicas, Especialidade de Parasitologia, pela Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

Este trabalho foi realizado sob a orientação da Professora Doutora Lenea Campino, na Unidade de Ensino e Investigação de Leishmnioses do Instituto de Higiene e Medicina Tropical com o apoio do Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais, Universidade Nova de Lisboa e financiado pelo projecto da Comunidade Europeia “Diagnostic and epidemiological markers for tracking of endemic and resurgent European leishmaniasis”, contrato QLK2-CT-2001-01810.

*Dedico este trabalho aos três Homens da
minha vida: o Rui, o Diogo e o Guilherme.*

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	xi
Publicações	xv
Resumo	xvii
Summary	xix
Índice de figuras	xxi
Índice de quadros	xxiii
Lista de abreviaturas	xxv
Capítulo 1 – Introdução geral	
1.1. Leishmanioses	3
1.2. O parasita <i>Leishmania</i>	8
1.2.1. Morfologia e ciclo de vida	8
1.2.2. Genoma	9
1.3. Vector e reservatório	12
1.4. Co-infecção <i>Leishmania</i> /VIH	14
1.5. Leishmaniose na bacia mediterrânica	17
1.6. Leishmaniose em Portugal	19
1.7. Epidemiologia molecular	23
1.8. Métodos de diagnóstico na leishmaniose	27
1.8.1. Diagnóstico imunológico	28
1.8.2. Diagnóstico parasitológico	30
1.8.3. Técnicas moleculares aplicadas ao diagnóstico	31
Capítulo 2 - Inquérito de leishmaniose canina	
2.1 Introdução	37
2.2 Material e métodos	38
2.2.1 Área do inquérito	38
2.2.2 Animais estudados	39
2.2.3 Diagnóstico seroimunológico	40

2.2.3.1	Imunofluorescência indirecta	41
2.2.3.2	Contraimmunoelectroforese	41
2.2.4	Diagnóstico parasitológico	41
2.2.5	Identificação isoenzimática das estirpes	42
2.2.6	Análise estatística	42
2.3	Resultados e Discussão	43
Capítulo 3 - Caracterização molecular de <i>Leishmania</i> por kDNA-PCR e		
hidrólise do DNA amplificado		
3.1	Introdução	51
3.2	Material e métodos	52
3.2.1	População estudada	52
3.2.1.1	Casos portugueses de leishmaniose humana	52
3.2.1.2	Casos portugueses de leishmaniose animal	53
3.2.1.3	Vector	55
3.2.1.4	Amostras de outros países	55
3.2.1.5	Amostras aplicadas ao estudo da estabilidade do kDNA e especificidade das sequências iniciadoras MC1 e MC2	57
3.2.2	Extracção de DNA	58
3.2.3	Amplificação do DNA	59
3.2.3.1	Escolha das sequências iniciadoras	59
3.2.3.2	Reacção de PCR	60
3.2.3.3	Visualização dos produtos de PCR	61
3.2.4	Purificação dos produtos amplificados por PCR	62
3.2.5	Seleção das endonucleases	63
3.2.6	Polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição de DNA-RFLP	64
3.2.7	Análise da diversidade genética	64
3.2.8	Análise estatística	65
3.3	Resultados	66
3.3.1	Produtos de PCR	66

3.3.2 Especificidade das sequências iniciadoras	67
3.3.3 Sensibilidade (Limiar de detecção) das sequências iniciadoras	68
3.3.4 Diversidade genética dos isolados estudados	69
3.4 Discussão	79
Capítulo 4 - Caracterização molecular de <i>Leishmania</i> por análise de microssatélites	
4.1 Introdução	89
4.2 Material e métodos	92
4.2.1 População estudada	92
4.2.2 Avaliação da especificidade das sequências iniciadoras dos <i>loci</i>	94
4.2.3 Extacção do DNA	94
4.2.4 Amplificação do DNA	94
4.2.5 Análise da variação do tamanho dos <i>loci</i> de microssatélites	97
4.2.5.1 Electroforese em gel de poliacrilamida	98
4.2.5.2 Electroforese em gel de agarose Metaphor®	99
4.2.5.3 Electroforese capilar automatizada por metodologia fluorescente	99
4.2.6 Análise bioinformática	100
4.3 Resultados	101
4.3.1 Avaliação da especificidade das sequências iniciadoras dos <i>loci</i>	101
4.3.2 Análise dos microssatélites em amostras clínicas	103
4.3.3 Análise electroforética dos microssatélites na população estudada	105
4.3.4 Diversidade genética na população estudada de <i>L. infantum</i>	108
4.4 Discussão	117
Capítulo 5 – Discussão geral e Conclusão	125
Referências bibliográficas	133
Apêndices	157

AGRADECIMENTOS

Professora Doutora Lenea Campino, quero, desde já, expressar a minha admiração e gratidão por si e, por todas as oportunidades de valorização e formação científica que me proporcionou. Obrigada pela orientação deste trabalho, pela sua constante insistência e entusiasmo, que fizeram com que chegasse até esta etapa científica da minha vida. Agradeço-lhe todos os conselhos (muitas vezes pessoais), apoio e palavras de incentivo que, ao longo destes anos, têm sido constantes. Peço desculpa pelos momentos familiares de que a privei para que este trabalho chegasse ao fim.

Ao Professor Doutor Pedro Abranches a quem devo o início do meu percurso profissional na área da Parasitologia, quando me aceitou na Unidade de Leishmanioses em 1996 para realizar o meu estágio de Licenciatura. Agradeço-lhe os conhecimentos científicos que então me transmitiu e recordo com saudade as reuniões de trabalho com os sempre presentes “momentos culturais”.

Agradeço à Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes os conhecimentos científicos e amizade que expressou desde que entrei na Unidade de Leishmanioses.

Agradeço aos Professores Doutor Ricardo Parreira e Doutor Pedro Cravo, o terem acedido fazer parte da comissão tutorial deste trabalho de doutoramento, e pelas suas sugestões e críticas científicas construtivas que contribuíram para a concretização deste trabalho. De um modo particular, agradeço ao Ricardo Parreira a constante disponibilidade no esclarecimento de dúvidas científicas e no apoio técnico prestado.

Agradeço ao Professor Michael Miles pela competente coordenação do projecto da EU “*Leishmania Genotyping*”, suporte deste trabalho, o me ter acolhido no seu laboratório para efectuar um estágio na área da biologia molecular, no “Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine” e pelo apoio científico prestado.

À Doutora Isabel Maurício, do “Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine”, com a qual tive o prazer de trabalhar desde que me integrei nos projectos da EU. Agradeço a amizade, a disponibilidade “on-line” constante, e os conhecimentos que me transmitiu na área da biologia e epidemiologia molecular, que estiveram na origem deste trabalho.

À Professora Doutora Gabriele Schonian, do “Institute of Microbiology and Hygiene, Charité Universitätsmedizin”, Berlim, agradeço a oportunidade que me deu em efectuar um estágio para aprofundamento dos conhecimentos teórico/práticos da análise de microssatélites.

Igualmente agradeço à Doutora Katrin Kuhls, do “Institute of Microbiology and Hygiene, Charité Universitätsmedizin”, a amizade e os conhecimentos que me transmitiu relacionados com a análise dos microssatélites quer durante o estágio, quer posteriormente, mostrando-se sempre disponível para ajudar.

À Maria João Martins, Ana Almeida, Mónica Nunes e Carla Lopes, agradeço toda a disponibilidade e o “apoio de bancada” prestado, sem o qual este trabalho não teria sido possível.

A todos os colegas que passaram pela Unidade de Leishmanioses, e a todos aqueles que ainda cá estão (Nuno Rolão, Olívia Rodrigues, Cláudia Marques, Carla Maia, Mónica Nunes, Carina Esteves, Marta Clemente, Ana Farinha, Mónica Marques e Sofia Henriques), pela amizade, espírito de entre-ajuda sempre presente e por todos os bons momentos que passámos dentro e fora do Instituto (tgifs!).

De um modo particular agradeço aos meus Amigos e colegas de longa data, Clara Leandro, Nuno Rolão, Sandra Pereira, e à Zézinha pelo companheirismo, amizade e disponibilidade constante.

À Carina Esteves, a minha última “escrava da bancada”, quero expressar o meu sentido agradecimento pelo apoio constante em todas as tarefas laboratoriais e pela revisão exaustiva que fez deste texto.

Aos técnicos da Unidade de Leishmanioses, José Manuel Cristóvão, João Ramada, e à auxiliar de laboratório Arminda Barbosa, por todo o apoio prestado.

Agradeço ao CMDT e ao seu coordenador, Prof. Doutor Luís Távora Távira, os apoios concedidos para a apresentação em congressos de trabalhos relacionados com esta tese. À Dr.^a Luzia Gonçalves, agradeço o apoio estatístico prestado.

Aos meus pais, o meu muito obrigada por me terem proporcionado todas as condições para que eu pudesse chegar aqui. À minha mãe (*in memorium*) que me fez perceber que devemos agarrar todas as oportunidades e que, nas etapas importantes da minha vida, me deu o empurrão de que precisava.

Rui, quero expressar o meu profundo agradecimento pelo Amor, paciência, presença e pelas palavras de incentivo nos momentos em que eu vacilei na continuação desta caminhada. Obrigada pela ajuda prestada na elaboração logística desta tese.

Ao meu filhote Diogo, quero agradecer as forças que me deu com a sua energia e ao mesmo tempo pedir desculpa pelas “ausências” em muitos momentos, ao longo dos seus cinco aninhos, em favor das viagens de trabalho, trabalho laboratorial e escrita deste trabalho. Ao meu mais recente filhote Guilherme, agradeço os estímulos (“pontapés”) para terminar esta tese, e me dedicar por completo à sua chegada.

A todos os que, de algum modo, contribuíram para a minha chegada ao fim desta etapa e que, por falha não intencional, não foram aqui mencionados, o meu sincero agradecimento.

PUBLICAÇÕES

Publicações relacionadas com o presente estudo:

Kuhls K., Chicharro C., Cañavate C., **Cortes S.**, Campino L., Haralambous C., Soteriadou K., Pratlong F., Dedet J.P., Maurício I., Miles M., Schaar M., Ochsenreither S., Radtke O., Schönian G. (2008). **Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1.** PLOS Neglected Tropical Diseases (*em publicação*).

Cortes S., Afonso O., Alves-Pires C., Campino L. (2007). **Stray dogs and leishmaniasis in urban areas. Portugal.** *Emerging Infectious Diseases*, **13**: 1431-2.

Cortes S., Maurício I., Almeida A., Cristóvão J.M., Pratlong F., Dedet J.-P., Campino L. (2006). **Application of kDNA as a Molecular Marker to analyse *Leishmania infantum* Diversity in Portugal.** *Parasitology International*, **55**: 277-83.

Ravel C., **Cortes S.**, Pratlong F., Morio F., Dedet J.-P., Campino L. (2006). **First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *L. infantum* and *L. major*.** *International Journal for Parasitology*, **36**: 1383-8.

Cortes S., Rolão N., Ramada J., Campino L. (2004). **PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l. specific kinetoplastid primers.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **98**, 12-17.

RESUMO

O presente estudo teve como principal objectivo avaliar a diversidade genética de uma população parasitária de *Leishmania* em isolados portugueses de hospedeiros humanos, caninos, vulpinos e do vector, aplicando dois marcadores moleculares: kDNA e microssatélites.

No **Capítulo 1** fez-se uma revisão bibliográfica sobre as leishmanioses incluindo a epidemiologia da infecção nos países da bacia mediterrânica nomeadamente Portugal. Deu-se especial relevo à epidemiologia molecular que nos últimos anos tem vindo a ser desenvolvida.

No **Capítulo 2** efectuou-se um inquérito de leishmaniose canina que abrangeu 374 cães provenientes da Região Metropolitana de Lisboa. Foi encontrada uma prevalência total de 19,2%, com a prevalência de 18,4% nos cães com dono e 21,6% nos cães sem dono ou vadios. Os resultados obtidos evidenciaram a importância dos cães vadios na transmissão do parasita e disseminação da doença. A partir dos 72 cães infectados, foram isolados 49 estirpes de *Leishmania*, tendo estas sido tipadas como *L. infantum* zimodeme MON-1. Estas estirpes, em conjunto com outras amostras isoladas a partir de humanos, vector e outros canídeos, foram utilizadas para avaliar a diversidade genética.

No **Capítulo 3** foram desenvolvidas sequências iniciadoras cinetoplastideais, MC1 e MC2, tendo-se estas revelado específicas e sensíveis para a identificação do complexo *L. donovani* isolados em cultura ou directamente a partir de amostras clínicas. Aplicou-se a metodologia de kDNA-PCR-RFLP na análise de 161 amostras de DNA, das quais 134 eram provenientes de isolados portugueses de *L. infantum*. Foram identificados 16 genótipos na totalidade das amostras, tendo 13 sido identificados nas amostras portuguesas. Observou-se a predominância do genótipo A, observado exclusivamente na população parasitária portuguesa. Em termos geográficos esta metodologia mostrou estar de acordo com a tipagem isoenzimática, e outros marcadores moleculares, individualizando as amostras provenientes de África num único genótipo. No entanto não se observou

individualização ao nível das regiões de Portugal estudadas, sugerindo a existência de fluxo genético entre as diferentes áreas geográficas.

No **Capítulo 4** aplicou-se a análise de 13 *loci* de microssatélites, polimórficos para *L. infantum*, em 154 amostras, das quais 128 eram provenientes de diferentes regiões geográficas de Portugal e de diferentes hospedeiros e vector. Obteve-se um maior grau de polimorfismo com estes marcadores do que com o kDNA, identificando-se 85 genótipos. Observou-se uma maior diversidade molecular nas amostras provenientes do Algarve e Alto Douro e, relativamente ao hospedeiro, estes alvos moleculares mostraram ser muito mais polimórficos no hospedeiro humano que o canino, indo ao encontro dos resultados de tipagem isoenzimática que se conhecem até à actualidade. Foi individualizado um agrupamento de amostras não MON-1 e dentro deste, um sub-agrupamento das amostras de África Oriental (Etiópia e Sudão), como anteriormente sugerido por outros autores.

No **Capítulo 5** discutiram-se os resultados obtidos permitindo verificar que a variabilidade dos parasitas *Leishmania* no nosso país é maior do que tem sido considerada até ao presente. Possibilitaram também o conhecimento de que há genótipos predominantes em Portugal e que a variabilidade genética no hospedeiro humano e no vector é superior à do reservatório doméstico e silvático.

SUMMARY

The main objective of the present study was to access genetic diversity of a *Leishmania* parasite population from human, canine, vulpine and vector portuguese isolates, by using two molecular markers: kDNA and microsatellites.

In **Chapter 1**, we have performed a bibliographic revision concerning leishmaniasis including epidemiology of the disease in the mediterranean countries namely Portugal. A special emphasis was given to molecular epidemiology that as been developed in the last years.

In **Chapter 2**, we have performed a canine survey on leishmaniasis which included 374 dogs from the Lisbon metropolitan region. An overall prevelance of 19,2%, with 18,4% in domestic dogs and 21,6% in stray dogs were found. The results highlight the importance of stray dogs in parasite's transmission and disease dissemination. From the 72 dogs that were found infected, 49 strains were isolated and typed as *L. infantum* MON-1. These strains, along with other human, vector and canine samples, were used to evaluate genetic diversity.

In **Chapter 3** we have developed kinetoplastid primers, MC1 and MC2, being these primers specific and sensitive for *L. donovani* complex identification in isolates from cultures or directly from clinical samples. kDNA-PCR-RFLP was applied on the analysis of 161 DNA samples, 134 of them belonging to *L. infantum* Portuguese isolates. 16 genotypes were identified in the total sample and 13 genotypes were identified in the portuguese samples. A predominance of genotype A was observed, which was exclusively found in the Portuguese parasite population. In terms of geographic distribution, this methodology showed to be in agreement with isoenzyme typing and with other molecular markers, separating a unique genotype for the samples from Africa. However, individualization was not observed in the studied geographic regions of Portugal suggesting the existence of genetic flow between the different regions.

In **Chapter 4**, 13 microsatellite *loci*, polymorphic for *L. infantum*, were studied in 154 samples, 128 of them belonging to the different geographic regions of Portugal

and different host and vector. A high degree of polymorphism was obtained with these markers than with kDNA, having identified 85 genotypes. Greater molecular diversity in samples from Algarve and Alto Douro was observed, and relatively to the host, human samples seemed to be more polymorphic than canine, which is in accordance with results from isoenzymatic typing that are currently known. A cluster of samples that are not MON-1 were individualized and within this group, a sub-cluster of samples of East Africa (Ethiopia and Sudan) as previously suggested by other authors.

In **Chapter 5**, we have discussed the results obtained with both markers, kDNA and microsatellites, and the molecular methodologies applied. The results from this study allowed us to conclude that *Leishmania* parasites in Portugal presently show higher variability than what has been observed in the past. This study also allows us to know that some genotypes are predominant in Portugal and human host and vector genetic variabilities are higher than in domestic and silvatic reservoirs.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Países com leishmaniose endémica e com co-infecção <i>Leishmania</i> /VIH...	15
Figura 1.2. Casos de LV notificados à DGS e diagnosticados na UEI de Leishmanioses HMT, no período compreendido entre 2000 e 2006.....	21
Figura 1.3. Casos de LV, de acordo com o estado imunitário, diagnosticados na UEI de Leishmanioses, IHMT, no período compreendido entre 2000 e 2006.....	21
Figura 2.1. Distribuição geográfica das áreas em estudo nos Distritos de Lisboa e Setúbal.....	39
Figura 2.2. Distribuição dos dois grupos de cães estudados (com dono e sem dono) nos diferentes concelhos.....	40
Figura 3.1. Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR com as sequências iniciadoras MC1/ MC2.....	66
Figura 3.2. Electroforese em gel de agarose dos produtos do PCR com aplicação das sequências iniciadoras MC1/MC2 em amostras de DNA de diferentes espécies de <i>Leishmania</i> em cultura, outros microrganismos e diferentes amostras clínicas não infectadas.....	67
Figura 3.3. Limiar de detecção do DNA cinetoplastideal aplicando as sequências iniciadoras MC1/ MC2 (A) e AJS1/DB8 (B).....	68
Figura 3.4. Exemplo de padrões de restrição obtidos com três das seis endonucleases em algumas das amostras analisadas.....	71
Figura 3.5. Dendrograma (“Neighbor-joining”) com base nas distâncias genéticas obtidas derivadas dos resultados de kDNA-PCR-RFLP (genótipos) de todas as estirpes..	78
Figura 4.1. Fotografia de um gel de agarose, após electroforese dos produtos de amplificação dos <i>loci</i> Lm2 e Lm4.....	105
Figura 4.2. Análise de fragmentos em PAGE 12 % de produtos de PCR amplificados para 2 marcadores.....	106

Figura 4.3. Análise de fragmentos em gel de agarose Metaphor® 4% de produtos de PCR.....	107
Figura 4.4. Representação gráfica da riqueza alélica dos diferentes <i>loci</i> no total de amostras da população portuguesa estudada.....	108
Figura 4.5. Representação gráfica da riqueza alélica dos diferentes <i>loci</i> de microssatélites observada nos vários grupos de hospedeiros vertebrados e vector.....	110
Figura 4.6. Representação gráfica da riqueza alélica na população parasitária nas regiões de Portugal nos <i>loci</i> de microssatélites estudados.....	111
Figura 4.7. Representação gráfica da riqueza alélica dos <i>loci</i> de microssatélites estudados nas amostras humanas, tendo em conta o estado imunitário dos doentes (imunocompetentes e imunodeprimidos).....	112
Figura 4.8. Dendrograma “Neighbor-Joining” baseadonas distâncias Dps calculadas a partir dos resultados dos 13 <i>loci</i> de 154 amostras de <i>L. infantum</i> e <i>L. donovani</i> (portuguesas e de referência).....	115

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.1. Patologia, principais vectores, reservatórios e distribuição geográfica das leishmanioses.....	7
Quadro 2.1. Distribuição da prevalência da infecção por grupo de animais.....	43
Quadro 3.1. Número, forma clínica, situação imunitária e distribuição geográfica das amostras humanas portuguesas.....	53
Quadro 3.2. Número e distribuição geográfica das amostras caninas portuguesas.....	54
Quadro 3.3. Origem geográfica, forma clínica e espécie de <i>Leishmania</i> das amostras provenientes de outros países.....	56
Quadro 3.4. Espécies de <i>Leishmania</i> e de outros microorganismos utilizados para o estudo da especificidade das sequências iniciadoras MC1/MC2.....	57
Quadro 3.5. Sequências iniciadoras utilizadas para a amplificação do DNA cinetoplastideal.....	60
Quadro 3.6. Condições de amplificação do kDNA com as sequências iniciadoras MC1 e MC2.....	61
Quadro 3.7. Endonucleases de restrição utilizadas, sequência reconhecida e n.º de fragmentos de hidrólise previstos na sequência de <i>L. infantum</i>	63
Quadro 3.8. Padrões originados pelos fragmentos de restrição obtidos com cada endonuclease.....	70
Quadro 3.9. Perfis de restrição ou genótipos obtidos.....	72
Quadro 3.10. Frequência absoluta (F) e relativa (f) dos diferentes perfis genotípicos encontrados na população parasitária portuguesa.....	73
Quadro 3.11. Distribuição geográfica dos 13 perfis de restrição identificados nas amostras portuguesas.....	74
Quadro 3.12. Distribuição dos perfis de restrição nos isolados humanos de acordo com o seu estado imunitário.....	74

Quadro 3.13. Distribuição geográfica dos perfis de restrição identificados nas amostras de outros países.....	75
Quadro 3.14. Distribuição dos perfis de restrição e zimodemes, de acordo os países de origem.....	77
Quadro 4.1. Sequências iniciadoras utilizadas, tipo de unidade de repetição e sua localização.....	95
Quadro 4.2. Temperaturas de ligação das sequências iniciadoras.....	97
Quadro 4.3. Especificidade dos <i>loci</i> de microssatélites pela amplificação de DNA de diferentes parasitas.....	102
Quadro 4.4. Amplificação dos <i>loci</i> de microssatélites por PCR em DNA de diferentes amostras clínicas humanas e caninas.....	104
Quadro 4.5. Características dos 13 marcadores de microssatélites utilizados para a análise da população de <i>L. infantum</i> em Portugal.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS

%	– Percentagem
°C	– Grau Celsius
mM	– Milimolar
<i>p</i>	– Probabilidade
p/v	– Peso/Volume
μm	– Micrometro
A	– Adenina
Ag	– Prata
APS	– Persulfato de amónio
CDC	– “Centre for Diseases Control”
CIE	– Contraimunoelctroforese
CPB	– Cisteína proteinase Beta
DAT	– Aglutinação directa
dATP	– 2’-desoxiadenosina 5’-trifosfato
dCTP	– 2’-desoxicitidina 5’-trifosfato
DGS	– Direcção-Geral de Saúde
dGTP	– 2’-desoxiguanosina 5’-trifosfato
DNA	– Ácido desoxiribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic acid”
Dps	– Proporção de alelos partilhados, do inglês “Proportion of shared alleles”
dTTP	– 2’-desoxitimidina 5’-trifosfato
EDTA	– Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	– “Enzyme-linked-immunosorbent assay”
Gp63	– Glicoproteína de 63 Kilo Dalton
gRNA	– Ácido ribonucleico guia, do inglês “Guide ribonucleic acid”
H _o	– Heterozigotia observada
H _e	– Heterozigotia esperada
HAART	– Terapêutica anti-retroviral altamente activa, do inglês “Highly active antiretroviral therapy”

HCL	– Ácido clorídrico
IFI	– Imunofluorescência indirecta
IHMT	– Instituto de Higiene e Medicina Tropical
INE	– Instituto Nacional de Estatística
ITS	– Espaçadores internos transcritos, do inglês “Internal transcribed spacers”
KDa	– Kilo Dalton
kDNA	– DNA cinetoplastideal
LC	– Leishmaniose cutânea
Lcan	– Leishmaniose canina
LCD	– Leishmaniose cutânea difusa
LMC	– Leishmaniose mucocutânea
LV	– Leishmaniose visceral
MgCl ₂	– Cloreto de magnésio
MLEE	– Electroforese enzimática de multilocus, do inglês “Multilocus enzyme electrophoresis”
MLMT	– Tipagem de microsatélites multilocus, do inglês “Multilocus microsatellite typing”
MLST	– Tipagem de sequência multilocus, do inglês “Multilocus sequence typing”
mRNA	– Ácido ribonucleico mensageiro, do inglês “Messenger ribonucleic acid”
NaCl	– Cloreto de sódio
NJ	– Junção de vizinhos, do inglês “Neighbor-Joining”
OMS	– Organização Mundial de Saúde
PAGE	– Electroforese em gel de poliacrilamida, do inglês “Polyacrylamide gel electrophoresis”
pb	– Pares de Bases
PBS	– Tampão fosfato salino, do inglês “Phosphate-buffered saline”
PCR	– Reacção da polimerase em cadeia, do inglês “Polymerase chain reaction”
PKDL	– Leishmaniose dérmica pós Kala-azar
R	– Riqueza alélica
RAPD	– Amplificação de polimórficos de distribuição aleatória, do inglês “Random amplified polymorphic DNA”
RFLP	– Hidrólise do DNA amplificado por endonucleases de restrição, do inglês “Restriction fragment lenght polymorphism”

rK39	– Proteína recombinante de 39 aminoácidos
RML	– Região metropolitana de Lisboa
RNA	– Ácido ribonucleico, do inglês “Ribonucleic acid”
rRNA	– Ácido ribonucleico ribossômico, do inglês “Ribosomal ribonucleic acid”
RNAr	– RNA ribossomal
<i>s.l.</i>	– <i>sensu lato</i>
SIDA	– Síndrome de imunodeficiência adquirida
SMM	– Modelo de mutação passo-a-passo, do inglês “Stepwise mutation model”
SSCP	– Técnica de polimorfismo conformacional de cadeia simples, do inglês “Single stranded conformation polymorfism”
SSU	– Pequena subunidade, do inglês “Small subunit”
T	– Timina
TAE	– Tampão tris-acetato-EDTA
TBE	– Tampão tris-borato-EDTA
TEMED	– Tetrametiletilenodiamina
Tris-HCl	– Tris (hidroximetilo) aminometano – ácido clorídrico
UEI	– Unidade de Ensino e Investigação
VIH	– Vírus da imunodeficiência humana
WHO	– Organização Mundial de Saúde, do inglês “World Health Organization”

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1. Introdução geral

1.1 Leishmanioses

Designam-se por leishmanioses as infecções que têm como agente etiológico um protozoário hemoflagelado intracelular pertencente ao género *Leishmania* Ross, 1903, família Trypanosomatidae, e ordem Kinetoplastida, possuindo um flagelo e dois genomas: DNA nuclear e DNA cinetoplastideal (kDNA). As formas clínicas manifestam-se através de uma diversidade de quadros clínicos desde lesões cutâneas de cura espontânea até à forma viscerotrópica, mais grave e potencialmente fatal. As leishmanioses, apesar de serem consideradas doenças negligenciadas, permanecem como um grave problema de Saúde Pública para o qual a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem dirigido especial atenção. Este grupo de doenças, são importantes em termos de morbilidade e, em alguns casos graves, de mortalidade.

As leishmanioses afectam essencialmente países tropicais e sub-tropicais, com uma prevalência mundial de 12 milhões de casos, ameaçando cerca de 350 milhões de pessoas nos quatro continentes afectados. A incidência anual está estimada em 1-1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500 000 casos de leishmaniose visceral. Dos 88 países afectados, 13 são países sub-desenvolvidos e 72 considerados países desenvolvidos, nos quais se encontram alguns países do Sudoeste da Europa onde a leishmaniose é endémica (Desjeux, 2004). No entanto é bastante difícil ter estimativas exactas quanto às incidências e prevalências em todo o Mundo, uma vez que os casos reportados são muito inferiores aos que presentemente ocorrem. A diferença entre a realidade e o número de casos conhecidos pode dever-se a alguns factores como a leishmaniose não ser uma doença de notificação obrigatória em muitos países (apenas 33 dos 88 países endémicos para a doença notificam), a distribuição descontínua nos locais de transmissão em áreas endémicas, a ausência de diagnóstico ou caso não reportado, sobretudo quando os doentes não têm acesso fácil a instituições de saúde e os meios de diagnóstico são raros ou inexistentes ou mesmo quando os medicamentos não

estão permanentemente disponíveis (Desjeux, 2004). De facto, a leishmaniose tem uma forte ligação à pobreza e, consequentemente, a condições de saúde e alojamento precárias e à má nutrição (Alvar *et al.*, 2006).

A epidemiologia das leishmanioses é extremamente variada: o género *Leishmania* engloba mais de 30 grupos taxonómicos, sendo cerca de 20 infectantes para humanos. Igualmente, encontram-se descritas aproximadamente 80 espécies ou sub-espécies de dípteros flebotomíneos, como vectores de *Leishmania* (Killick-Kendrick & Rioux, 2002). Existem duas importantes entidades epidemiológicas: zoonótica, que engloba reservatórios animais no ciclo de transmissão e antroponótica, na qual a infecção é transmitida homem a homem (Dedet & Pratlong, 2003).

No complexo de doenças que incluem as leishmanioses encontram-se a leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose cutânea difusa (LCD).

A LV, também designada na Ásia por “febre negra” ou Kala-azar, é considerada a forma mais grave da doença, podendo ser mortal se não for tratada. Dos 500 000 novos casos que ocorrem anualmente em 47 países, 90% encontram-se no Bangladesh, Brasil, Índia, Sudão e Nepal (Desjeux, 2004). A LV é causada por *Leishmania donovani* no sub-contidente Indiano, África oriental e algumas regiões da China onde, devido à natureza antropofílica do vector, se observa a manutenção de um ciclo antroponótico. *L. archibaldi*, segundo a identificação por tipagem isoenzimática, é também considerada como o parasita responsável pela LV no Sudão e Etiópia (Pratlong *et al.*, 2001). No sudoeste da Europa e Bacia Mediterrânica a LV tem como agente etiológico *L. infantum* e, no Novo Mundo, essencialmente no Brasil, *L. chagasi* (Desjeux, 2004) (Quadro 1.1). *L. chagasi* considera-se presentemente como sendo indistinguível de *L. infantum* (Maurício *et al.*, 2000). A LV do tipo mediterrânico e na América do Sul é, na sua maioria, uma zoonose sendo transmitida por flebótomos do sub-género *Laroussious* (Killick-Kendrick & Rioux, 2002), e tem como principal reservatório o cão. Contudo, independentemente da localização geográfica da LV, esta caracteriza-se pela presença de febre persistente, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatias e anemia. Como a LV é uma doença que afecta inicialmente o sistema retículo-endotelial, a substituição das células infectadas provoca hiperplasia e, consequentemente, um aumento do tamanho dos órgãos como o baço e o fígado. No Kala-azar indiano, as

formas amastigotas do parasita são detectadas frequentemente no sangue periférico. Em alguns doentes surgem meses ou anos após tratamento das lesões viscerais, lesões cutâneas, por todo o corpo, ricas em amastigotas, sendo esta forma clínica designada por leishmaniose dérmica pós-Kala-azar (PKDL). Considera-se que a presença de parasitas na pele é responsável pela manutenção do ciclo antroponótico.

A LC caracteriza-se geralmente pela presença de lesões cutâneas localizadas. 90% dos casos de LC ocorrem na Síria, Sul da Arábia, Irão, Afeganistão, Argélia, Brasil e Perú. No Velho Mundo, as principais espécies responsáveis pela LC são *L. major*, *L. aethiopica* e *L. tropica*, sendo frequentes as lesões cutâneas causadas por *L. infantum* na Bacia Mediterrânica e na ex-União Soviética (WHO, 1990). Até à data todas as estirpes causadoras de LC nos países europeus foram identificadas como *L. infantum*. *L. major* é a espécie responsável pela LC zoonótica, contando com uma larga distribuição desde regiões do Norte de África, oriental e ocidental, bem como médio e próximo Oriente e Ásia central. *L. tropica* é considerada responsável pelo ciclo antroponótico em diversas zonas do médio e próximo Oriente e *L. aethiopica* é responsável pela LC na Etiópia e Quénia (Dedet, 2002).

No Novo Mundo, a LC é causada por várias espécies do sub-género *Viannia* (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*) e do sub-género *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. mexicana*), sendo o ciclo de transmissão zoonótico (Quadro 1). No entanto, *L. braziliensis* é a espécie que tem uma distribuição mais alargada, desde o sul do México ao norte da Argentina e Brasil. *L. amazonensis* tem igualmente uma ampla distribuição na América do Sul. As outras espécies têm uma distribuição mais restrita: *L. guyanensis* no norte da Amazónia, *L. panamensis* na Colômbia e América central, *L. mexicana* no México e América Central e *L. peruviana* nos Vales Andinos do Perú.

A LC, de um modo geral, caracteriza-se pelo aparecimento de uma pápula eritematosa ou nódulo no local da picada, ulcerando após algumas semanas. As lesões podem, posteriormente, surgir em qualquer parte do corpo no entanto, as zonas mais afectadas são os membros e a face. As formas cutâneas do Velho Mundo são frequentemente de cura espontânea. As lesões podem ser múltiplas causando cicatrizes indeléveis.

A LCD é uma forma clínica bastante rara resultante de um défice de imunidade celular dos indivíduos afectados. Esta forma da doença não manifesta tendência para a

cura e frequentemente apresenta resistência à terapêutica, manifestando-se por nódulos em grandes extensões do corpo que não costumam ulcerar confundindo-se com lepra lepromatosa (Dedet & Pratlong, 2003). A LCD ocorre na Etiópia, Quênia e Namíbia, tendo como reservatório o hirax e agente etiológico *L. aethiopica* e *L. amazonensis* no Novo Mundo. No entanto, mais recentemente têm surgido casos de LCD associados a outras espécies, nomeadamente no Velho Mundo, *L. major* e *L. infantum*, em indivíduos imunodeprimidos (Develoux *et al.*, 1996; Durand *et al.*, 1998).

A LMC ou Espúndia é endêmica na América Central e do Sul, é provocada por *L. braziliensis* e de transmissão zoonótica, os reservatórios são pequenos roedores silváticos (Dedet & Pratlong, 2003). A lesão primária provoca uma úlcera semelhante à causada por outras espécies dermatrópicas de *Leishmania*. Uma percentagem significativa dos casos (2-40%) evolui com lesões secundárias originando a destruição das cartilagens e mucosas das fossas nasais e evoluindo posteriormente para a mucosa bucal, faringe e laringe, provocando lesões mutilantes graves. Embora raramente, *L. guyanensis* pode causar LMC (Dedet & Pratlong, 2003).

Presentemente, o método standard de identificação e diferenciação de espécies e sub-espécies em *Leishmania*, e universalmente aceite, é a electroforese enzimática multilocus ou tipagem isoenzimática, efectuada em Centros de Referência da OMS. Este tipo de classificação tem por base a mobilidade electroforética de isoenzimas, requerendo a análise de 8-15 enzimas diferentes que, depois de separadas num gel de acetato de celulose, de acordo com a sua carga iónica, formam um padrão específico. Este padrão é definido como o arranjo único de bandas produzidas pelas diferentes isoenzimas. O conjunto das bandas (uma por enzima), produzidas por um determinado isolado origina o seu perfil isoenzimático, onde os grupos de isolados com o mesmo perfil isoenzimático se designam por zimodemes (Rioux *et al.*, 1990).

Esta unidade taxonómica, embora não seja reconhecida pelo Código Internacional de Nomenclatura, tem-se revelado muito útil na identificação do parasita e tem sido amplamente utilizada em estudos epidemiológicos.

Quadro 1.1: Patologia, principais vectores, reservatórios e distribuição geográfica das leishmanioses (Desjeux, 1992; Killick-Kendrick & Rioux, 2002; Shaw, 2002; Dedet & Pratlong, 2003).

	Espécie	Patologia habitual Patologia rara	Principais vectores	Reservatórios	Distribuição geográfica
Sub-género <i>Leishmania</i>					
Velho Mundo	<i>L. infantum</i>	VL LCL, LCD*	<i>Ph. ariasi</i> <i>Ph. perniciosus</i> <i>Ph. chinensis</i>	Canídeos	Região Mediterrânea, Balcãs, Médio Oriente, Ásia Central, China
	<i>L. donovani</i>	LV LCL	<i>Ph. argentipes</i> <i>Ph. martini</i> <i>Ph. orientalis</i> <i>Ph. alexandri</i>	Homem; Roedores? Canídeos?	Índia, Paquistão, China, Quênia, Sudão, Etiópia
	<i>L. major</i>	LCL LCD*	<i>Ph. papatasi</i> <i>Ph. duboscqi</i>	Roedores	Norte, Este e Oeste África, Próximo e Médio Oriente, Ásia Central
	<i>L. tropica</i>	LCL LV	<i>Ph. sergenti</i>	Homem; Canídeos?	Médio Oriente, Paquistão, Índia, Região Mediterrânea
	<i>L. aethiopica</i>	LCL LCD	<i>Ph. longipes</i> <i>Ph. pedifer</i>	Hiraxes	Etiópia e Quênia
Novo Mundo	<i>L. chagasi</i> / <i>L. infantum</i>	LV LCL, LCD	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. evansi</i>	Canídeos	América Central e do Sul
	<i>L. mexicana</i>	LCL LCD, LV*	<i>Lu. olmeca olmeca</i>	Roedores; Canídeos	América Central e do Sul
	<i>L. amazonensis</i>	LCL LCD, VL	<i>Lu. flaviscutellata</i>	Roedores Marsupiais	América Central e do Sul
	<i>L. venezuelensis</i>	LCL	<i>Lu. rangelliana</i>	Equinos e Felinos	Venezuela
Sub-género <i>Viannia</i>					
Novo Mundo	<i>L. peruviana</i>	LCL	<i>Lu. peruensis</i> <i>Lu. verrucarum</i>	Canídeos Roedores	Perú
	<i>L. lainsoni</i>	LCL	<i>Lu. ubiquitalis</i>	Roedor	Brasil, Perú
	<i>L. naiffi</i>	LCL	<i>Lu. ayrozai</i> <i>Lu. paraensis</i>	Desdentados	Brasil
	<i>L. shawi</i>	LCL	<i>Lu. whitmani</i>	Primatas Perguiças	Brasil
	<i>L. guyanensis</i>	LCL LMC	<i>Lu. umbratilis</i>	Perguiças; Roedores, Marsupiais	América do Sul
	<i>L. panamensis</i>	LCL LMC, LCD*	<i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. trapidoi</i> <i>Lu. gomezi</i>	Perguiças; Primatas, Marsupiais, Roedores, Canídeos	América Central e do Sul
	<i>L. braziliensis</i>	LCL, LMC LCD*, LV*	<i>Lu. wellcomei</i>	Canídeos, Equinos e Roedores	América Central e do Sul

L. - *Leishmania*; *Ph.* - *Phlebotomus*; *Lu.* - *Lutzomia*; LV - leishmaniose visceral; LCL – leishmaniose cutânea localizada; LCD – leishmaniose cutânea difusa; LMC – leishmaniose mucocutânea; * em estádios de imunossupressão

1.2 O parasita *Leishmania*

1.2.1 Morfologia e ciclo de vida

O parasita *Leishmania* é um eucariota unicelular, que se reproduz por divisão binária, possuindo no seu ciclo de vida duas formas distintas: uma forma promastigota, flagelada e móvel, e uma forma amastigota, sem flagelo e imóvel.

As formas promastigotas são móveis, encontrando-se no aparelho digestivo do insecto vector. Estas formas medem cerca de 10-20 µm de comprimento e 1,5-3,0 µm de largura, possuem um flagelo que tem origem no corpo basal do cinetoplasto e que emerge livremente na extremidade anterior da célula.

Durante o processo de desenvolvimento dos promastigotas no tubo digestivo do insecto vector, observam-se duas formas distintas, as procíclicas, que são alongadas e maiores que as formas amastigotas possuindo um flagelo habitualmente mais curto que o corpo celular. As formas metacíclicas são relativamente curtas e arredondadas com um flagelo longo, duas a três vezes mais comprido que o corpo celular e com grande mobilidade. Estas formas constituem a fase final de desenvolvimento que ocorre no vector e que é inoculada no hospedeiro vertebrado (Howard *et al.*, 1987; Killick-Kendrick, 1990). O ciclo biológico da *Leishmania* nos vectores é um processo complexo envolvendo alterações comportamentais, morfológicas e bioquímicas, diferindo entre as várias espécies do parasita. Dependendo da espécie de *Leishmania*, o desenvolvimento do parasita no insecto pode completar-se entre 4 a 17 dias após a refeição sanguínea do flebótomo fêmea (Molyneux & Killick-Kendrick, 1987).

As formas amastigotas encontram-se nos hospedeiros vertebrados, sendo formações ovóides ou arredondadas com 2,5-6,8 µm de comprimento, sem flagelo livre. Estas formas localizam-se intracelularmente nas células fagocíticas mononucleares. Para além dos outros organelos, em preparações coradas com Giemsa observam-se o núcleo, relativamente grande, e o cinetoplasto em forma de bastonete, mais pequeno e em posição anterior relativamente ao primeiro, possuindo grande quantidade de kDNA e que prolonga a única mitocôndria da célula.

De um modo geral, a infecção por *Leishmania* resulta da transmissão do parasita por picada de insectos hematófagos. Ao efectuar a sua refeição sanguínea no reservatório mamífero infectado, o insecto vector fêmea ingere as formas amastigotas de

Leishmania, diferenciando-se estas em formas promastigotas flageladas e alongadas (nectomonas), dando-se então início a uma fase de multiplicação logarítmica em que os parasitas não são infecciosos (Killick-Kendrick, 1990). Após alguns dias, estas formas transformam-se em promastigotas metacíclicas com grande mobilidade. Cerca de nove dias depois migram para a zona proximal do tubo digestivo (esófago, faringe), prontas a serem inoculadas no hospedeiro vertebrado durante a próxima refeição. É nesta altura que o flebótomo fêmea, ao efectuar a sua refeição sanguínea de que necessita para a maturação dos ovos, inocula as formas promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro vertebrado. Estas formas são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos, passam à forma amastigota, multiplicam-se por divisão binária nos fagolisossomas das células fagocíticas, provocando a sua destruição ao romper a membrana celular; as formas amastigotas são fagocitadas por novos macrófagos.

1.2.2 Genoma

O parasita *Leishmania* possui dois genomas, representados pelo DNA nuclear e pelo kDNA. O género *Leishmania* apresenta um cariótipo de 36 cromosomas variando em tamanho de 0,35 Mb a aproximadamente 3 Mb, com um tamanho total estimado de 34,7 Mb. A estrutura dos cromossomas de *Leishmania* parece comparável aos de outros protozoários, com uma região central de sequências conservadas de baixo número de cópias ou de cópia única e longos “stretches” de sequências repetitivas sub-teloméricas e teloméricas (Wincker *et al.*, 1996). A diploidia em *Leishmania* está actualmente aceite, com a hipótese de alguns cromossomas serem aneuploides (Banuls *et al.*, 2007). Apesar de alguns autores suspeitarem da existência de recombinação genética em *Leishmania*, sugerem que este evento é, provavelmente, extremamente raro em condições naturais (Tibayrenc & Ayala, 1999). Apenas um número reduzido de referências bibliográficas têm reportado o isolamento de estirpes que foram caracterizadas como putativos híbridos entre diferentes espécies de *Leishmania*. Estes híbridos ocorrem essencialmente entre espécies próximas, como *L. braziliensis* e *L. panamensis* ou *L. peruviana* (Belli *et al.*, 1994; Dujardin *et al.*, 1995; Banuls *et al.*, 1997; Torrico *et al.*, 1999), *L. major* e *L. arabica* (Evans *et al.*, 1987; Kelly *et al.*, 1991). Mais recentemente, foi pela primeira vez descrita a existência de duas estirpes

híbridas entre duas espécies filogeneticamente e epidemiologicamente muito distantes: *L. major* e *L. infantum* (Ravel *et al.*, 2006). No entanto, ainda não foi possível obter híbridos em laboratório, sugerindo que a frequência de recombinação sexual é muito baixa. A raridade da recombinação sexual e o seu baixo impacto na estrutura populacional apoiam a teoria de que existe essencialmente uma expansão clonal, semelhante ao observado em outros tripanossomídeos. Existem mecanismos assexuados de troca genética que tornam a recombinação sexual desnecessária e rara, dado que preconizam de um modo eficaz a existência de genótipos diferentes que conferem robustez ao parasita (Victoir & Dujardin, 2002). De acordo com o modelo proposto por Lythgoe (2000), os parasitas *Leishmania* desenvolveram mecanismos não-sexuais que permitiram gerar um repertório variado de genótipos necessário à sua adaptação a “ambientes” heterogêneos. Um desses mecanismos, que está bem documentado para *Leishmania*, é a amplificação génica que inclui:

- Repetições sucessivas de genes constitutivos e de factores de virulência (Spithill & Samaras, 1987; Inga *et al.*, 1998; Kebede *et al.*, 1999);
- Amplificação de segmentos curtos e longos de cromossomas, sob a forma de DNA circular ou linear (Ouellette & Papadopoulos, 1993);
- Alterações no número de cromossomas (ploidia) (Cruz *et al.*, 1993).

Segundo Victoir & Dujardin (2002), a combinação de repetições sucessivas e de recombinação intragénica amplifica os genes e gera diversidade genotípica, a qual se pode traduzir numa maior capacidade de evolução adaptativa, que se reflecte no sucesso do parasitismo evidenciado pelo género *Leishmania*.

O cinetoplasto é um organelo em forma de disco, microscopicamente visível com 1-2 μm de diâmetro, que contém aproximadamente 10^7 pares de bases (pb) de DNA mitocondrial, e representa 10-20% do DNA total (Simpson *et al.*, 1987). O DNA do cinetoplasto é constituído por cerca de 50 maxicírculos (com 20 000 a 35 000 pb), que contêm genes que codificam proteínas mitocondriais e para o RNA ribossomal (rRNA), e cerca de 10 000 a 20 000 minicírculos com sequências de 500 a 2500 pb (tamanho médio de 800 pb). Estima-se que o número de classes de minicírculos seja superior a 60, podendo as sequências variar dentro de cada classe, sendo cerca de 10 em cada espécie de *Leishmania* (Yurchenko *et al.*, 1999). Apesar de não parecerem ter

função codificante de proteínas, algumas sequências dos minicírculos são transcritas em cadeias de RNA. Sturm & Simpson (1990) sugeriram que uma das principais funções dos minicírculos é a codificação de RNA guia (gRNA), cadeias de RNA indispensáveis para a edição do RNA mensageiro (mRNA), um mecanismo essencial para a expressão dos genes mitocondriais dos tripanossomatídeos, denominado por edição do RNA. A edição do RNA é definida como um processo de alteração pós-transcricional das sequências nucleotídicas de regiões codificantes dos transcripts que, no caso dos tripanossomatídeos, consiste na adição (ou, menos frequentemente, na remoção) de nucleótidos de uracilo (U), alterando a sequência do pré-mRNA e, assim, o sentido da sua mensagem (Benne, 1993). A informação que especifica como o pré-mRNA deve ser alterado, está contida em pequenas moléculas de RNA (com cerca de 40 a 80 nucleótidos) transcritas separadamente, constituindo o gRNA. Estas moléculas contêm, no terminal 5', uma sequência complementar a uma das extremidades da cadeia de mRNA a ser editado, seguida de uma sequência que especifica os nucleótidos a serem inseridos no transcripto e, por fim, no terminal 3', contém uma sequência contínua de nucleótidos U. Considera-se, por isso, que a função da edição do RNA é a produção de diferentes cadeias de mRNA em diferentes situações, podendo ser visto como um mecanismo relativamente primitivo de alteração da expressão génica. Esta hipótese é suportada pelo facto de os tripanossomatídeos serem organismos eucariotas unicelulares muito antigos, que desde muito cedo divergiram da linha evolutiva que conduziu às plantas e aos animais, e por se considerar que as próprias mitocondrias contêm um sistema genético primitivo (Sollner-Webb, 1991).

Em todos os tripanossomatídeos, dos cerca de 800 pb em média que constituem o minicírculo, cerca de 600 a 680 bp correspondem a uma região variável e cerca de 120 a 200 pb correspondem a uma região conservada que contém a origem putativa de replicação (50 pb). Dentro desta região conservada encontram-se três blocos de sequências altamente conservadas, designados por Bloco de Sequência Conservada ("Conserved Sequence Block", CSB): o CSB 1 (GGGCGT), o CSB2 (CCCCGTTC) e o CSB 3 (GGGGTTGGTGTA). O bloco CSB 3 possui a sequência universal, a qual está presente em todos os minicírculos de todas as espécies de tripanossomatídeos (Barker, 1987; Yurchenko *et al.*, 1999). A região conservada, que contém a origem de replicação do minicírculo, é rodeada de ambos os lados por uma região variável, de

aproximadamente 600 pb, rica em adeninas (A) e timinas (T) e que também contém os genes que codificam o gRNA. O significado da variação dos minicírculos é pouco conhecida, no entanto a manutenção desta variação pode ser uma vantagem selectiva (Borst, 1991).

1.3 Vector e reservatório

O insecto vector díptero envolvido no ciclo natural da infecção por *Leishmania* é um hematófago da família *Psychodidae*, sub-família *Phlebotominae*. Os flebótomos são insectos pequenos (1,5-3,5 mm de comprimento), caracterizados por possuírem asas estreitas e erectas, corpo delgado, patas compridas e mandíbulas longas (Sádlová, 1999). Existem três géneros de flebotomíneos: o género *Phlebotomus* (*Ph.*), que se encontra no Velho Mundo, em áreas semi-áridas e regiões da savana; o género *Lutzomyia* (*Lu.*) que se encontra preferencialmente em zonas florestais; e o género *Sergentomyia* que engloba espécies que se alimentam em répteis e que são vectores de *Sauroleishmania*. Os dois primeiros géneros são vectores de *Leishmania*.

No Velho Mundo, os principais vectores de *Leishmania* pertencem ao sub-género *Larroussius*, sendo *Ph. (Larroussius) perniciosus* e *Ph. (Larroussius) ariasi* as espécies mais importantes na parte ocidental da bacia mediterrânica. Estes são considerados antropofílicos e zoofílicos no entanto, apresentam clara preferência pelos animais (Ashford & Bettini, 1987). Ambas as espécies são vectores conhecidos de *L. infantum*.

L. major, é responsável por grande parte das leishmanioses cutâneas no Norte de África, e tem como principal vector *Ph. papatasi* (Chelbi & Zhioua, 2007). *L. tropica* tem como principal vector *Ph. sergenti*. Em Portugal, país onde a espécie de *Leishmania* dominante é *L. infantum*, já têm sido capturados, em duas regiões distintas, *Ph. sergenti* e *Ph. papatasi* (Schrey *et al.*, 1989; Alves-Pires *et al.*, 2001; Afonso *et al.*, 2005).

No Novo Mundo, o vector mais importante na LV é *Lu. longipalpis*, sendo *Lu. (Nyssomyia) whitmani* o vector responsável pela transmissão de algumas espécies de *Leishmania* que causam LC. No entanto, a diversidade de espécies de *Leishmania* e de

flebótomos suspeitos nesta região neotropical, contribuem para uma longa e complexa lista de espécies vectores ou potenciais vectores. A eficiência da transmissão do parasita pelos flebótomos apresenta grande variabilidade, dependendo da longevidade, preferências tróficas e densidade dos vectores. Assim, populações vectoriais que vivam junto a um bom reservatório terão provavelmente uma maior capacidade de transmissão (Bryceson, 1996). Por outro lado, a distância de voo dos flebótomos é limitada, daí que o hospedeiro vertebrado tenha que invadir ou viver próximo do habitat do vector para estar em risco de ficar infectado com *Leishmania*.

Segundo Rioux *et al.* (1969), o hospedeiro animal pode ser habitual, primário ou secundário, e acidental. Só o primeiro deve ser considerado um verdadeiro reservatório. O reservatório habitual deve ser fonte próxima para a infecção humana através do vector, ser susceptível ao agente patogénico, apresentá-lo em local acessível ao vector e no estágio ideal para que ocorra infecção, ser a principal fonte de alimentação para o vector e viver no mesmo habitat que este. De igual modo, a evolução da infecção deve apresentar um carácter crónico com desenvolvimento arrastado de modo a permitir a sobrevivência do animal durante o período sazonal de actividade do vector (Bray, 1982). Por outro lado, um hospedeiro acidental é aquele em que a infecção ocorre em condições excepcionais e raras, não permitindo a continuação do ciclo biológico do parasita. Apesar de não desempenharem um papel significativo na epidemiologia das leishmanioses, a sua importância não deve ser descurada, uma vez que estes podem introduzir ou reintroduzir a infecção em novas áreas. O cavalo (Koehler *et al.*, 2002, Rolão *et al.*, 2005), o urso (Garham, 1965), o lobo (Rebelo, 1993) e o gato (Poli *et al.*, 2002) têm sido referidos como hospedeiros acidentais. Recentemente, tem sido colocada a hipótese de que o gato possa desempenhar um papel de reservatório habitual em vez de hospedeiro acidental (Solano-Gallego *et al.*, 2007; Maia *et al.*, *em publicação*).

Os canídeos, nomeadamente cães e raposas, são considerados os principais reservatórios da LV no Velho e Novo Mundo. Na LC os roedores são os principais reservatórios da maioria das espécies de *Leishmania*, no entanto, primatas, marsupiais, hiraxes, armadilhos e preguiças têm sido também considerados reservatórios de diferentes espécies dermatrópicas de *Leishmania* no Novo Mundo.

Na bacia mediterrânica e, nomeadamente em Portugal, a leishmaniose é considerada uma zoonose, em que o cão é o principal reservatório e também o principal hospedeiro do parasita (Cortes *et al.*, 2007).

No Sul da Europa, a LV zoonótica causada por *L. infantum* era considerada uma doença rural no entanto, presentemente é cada vez mais frequentemente diagnosticada em áreas urbanas. A ocorrência de surtos de LV ou aparecimento de novas áreas endémicas em zonas urbanas/peri-urbanas está associada à “urbanização” dos focos naturais zoonóticos. Está também associada com o aumento de habitações unifamiliares, na periferia das cidades, com jardim onde os cães domésticos habitualmente se encontram, favorecendo a existência de bons habitats para os flebótomos (Campino, 2002). Também o nível de conhecimento da população em geral e em particular de donos de cães, sobre esta zoonose, deve ser tido em conta, sendo essencial realizar acções de sensibilização e esclarecimento, para que possam ser usadas medidas profilácticas efectivas contra esta zoonose (Neves *et al.*, 2007). Por outro lado, o desenvolvimento das zonas sub-urbanas pode levar a um aumento dos resíduos sólidos e, por vezes, condições sanitárias deficientes, e consequentemente atraindo cães vadios. Estes animais que vivem sempre ao ar livre são um alvo mais fácil para a picada do insecto vector e, consequentemente, para a transmissão da infecção, uma vez que frequentemente estão em condições físicas precárias. Este grupo de animais pode ser responsável pela acrescida dificuldade no controlo da leishmaniose canina (Cortes *et al.*, 2007).

1.4 Co-infecção *Leishmania*/VIH

O desenvolvimento da pandemia do vírus da imunodeficiência humana/síndrome de imunodeficiência adquirida (VIH/SIDA) que se verificou nos últimos vinte anos modificou o panorama das leishmanioses tanto no campo clínico como epidemiológico, tendo já sido reportados casos de co-infecção *Leishmania*/VIH em 35 países (Desjeux & Alvar, 2003). Este aumento do número de casos de co-infectados pode dever-se fundamentalmente à “urbanização” das leishmanioses e “ruralização” da infecção por

VIH, observando-se um aumento da população humana nas áreas sub-urbanas, onde abundam o vector e o reservatório, propiciando a sobreposição das duas infecções (Cruz *et al.*, 2006). A infecção pelo VIH aumenta o risco do desenvolvimento LV de 100 a 1000 vezes nas áreas endémicas (WHO, 2000), reduz a eficácia da resposta terapêutica e aumenta a probabilidade de ocorrerem recaídas. A infecção por *Leishmania* foi sugerida como a terceira parasitose oportunista mais frequente em indivíduos infectados com o VIH, a seguir à toxoplasmose e criptosporidiose (Alvar *et al.*, 1997). Presentemente observa-se a tuberculose como a infecção oportunista mais frequente nos indivíduos seropositivos.

A maior prevalência de co-infecção *Leishmania*/VIH ocorre nos países do sudoeste da Europa nomeadamente Espanha, França, Itália e Portugal. No continente Americano, o Brasil é o país com mais casos declarados. Na Ásia, a co-infecção está a aumentar em especial na Índia, Bangladesh e Nepal com a agravante de que nestes países o parasita apresenta resistência aos antimónios, fármacos de primeira linha naqueles países (Figura 1.1). Em África as perspectivas são de que o número de casos aumente devido às condições de saúde precárias e às guerras existentes neste continente (WHO, 2007).

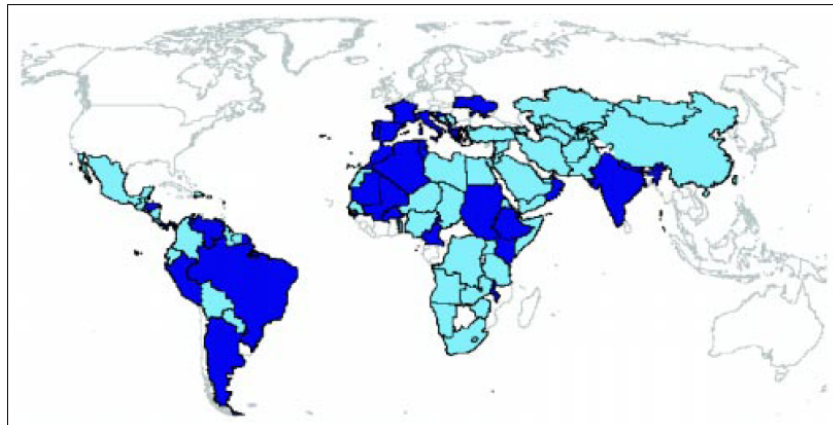


Figura 1.1. Países com leishmaniose endémica e com co-infecção *Leishmania*/VIH.

■ Distribuição global de leishmaniose; ■ Países que reportaram co-infecção. (in Desjeux & Alvar, 2003).

Nos países da bacia mediterrânica mais de 70% dos casos de LV estão associados a indivíduos adultos infectados com o VIH. Destes, entre 50 a 90% são

dependentes de drogas administradas por via endovenosa (DDE), que têm como hábito a partilha de agulhas e seringas (Campino *et al.*, 1994a; Cruz *et al.*, 2006). Assim, foi proposto uma forma alternativa ao ciclo de transmissão de *Leishmania*, a transmissão antroponótica artificial onde a transmissão do parasita ocorre através de agulhas ou seringas contaminadas (Alvar & Jiménez, 1994). Este facto foi suportado por uma série de estudos, como a identificação de zimodemes em co-infectados DDE que nunca foram isolados em imunocompetentes ou em cães (Chicharro *et al.*, 2003). À excepção de Portugal, depois da introdução da terapia anti-retroviral altamente activa (HAART) em 1997, tem-se observado nos países Europeus uma diminuição dos casos de leishmaniose nos doentes com VIH/SIDA.

Por outro lado, a fraca resposta à terapêutica, o elevado número de recidivas, a diversidade de parasitas isolados nos indivíduos infectados pelo VIH, aliadas a manifestações clínicas atípicas que dificultam o diagnóstico, fazem com que os indivíduos co-infectados possam contribuir para o aumento do número de casos humanos nas áreas onde a transmissão da leishmaniose é antroponótica. Igualmente estas características facilitam a origem de focos de transmissão antroponótica em zonas onde a transmissão era tradicionalmente zoonótica (Paredes *et al.*, 2003).

De acordo com os conhecimentos actuais nos indivíduos infectados pelo VIH, o protozoário *Leishmania* pode comportar-se como um agente oportunista, e a leishmaniose deveria pois, ser incluída nas doenças que definem a SIDA (WHO, 2000). Relativamente à apresentação clínica e diagnóstico, a leishmaniose associada à infecção por VIH apresenta várias características: (i) disseminação do parasita via sistema retículo-endotelial sem envolvimento visceral, originando a LCD; (ii) localizações atípicas como consequência da dispersão do parasita e de deficiência na imunidade celular; (iii) progressão crónica e recaídas, independentemente do tratamento recebido; (iv) fraca resposta à terapia; (v) baixa taxa de anticorpos anti-*Leishmania* (Cruz *et al.*, 2006).

1.5 Leishmaniose na bacia mediterrânica

As leishmanioses são comuns na bacia mediterrânica e conhecidas desde o século XIX. As principais espécies de *Leishmania* que se encontram na bacia mediterrânica são *L. infantum*, *L. major* e *L. tropica*. *L. infantum* é responsável pela LV e está distribuída por todo o Mediterrâneo, afectando humanos e cães, sendo o cão o principal reservatório. *L. major* causa LC e está distribuída por todo o Norte de África e Médio Oriente, tendo várias espécies de roedores como reservatório. Também *L. tropica* está presente no Médio Oriente, Norte de África e em algumas regiões do Sul da Grécia, sendo responsável por LC antroponótica. Em alguns países, como a Tunísia, Marrocos e Israel, podem encontrar-se as três entidades (Gradoni *et al.*, 1984).

Os primeiros registos são da Grécia, onde, actualmente, as duas formas da doença, LV e LC, estão presentes. O principal agente etiológico da LV é *L. infantum*, (Papadopolou *et al.*, 2005). De 1994-2001 Papadopolou *et al.* (2005) observaram, na região noroeste da Grécia, uma prevalência de leishmaniose nas populações humanas sintomática e assintomática de 12.6% e 0.5%, respectivamente.

Relativamente aos países do Médio Oriente, a Turquia é um dos países em que, desde há muito, se conhecem casos de LV em adultos, crianças e cães causada por *L. infantum* e LC antroponótica causada por *L. tropica*, nas regiões oeste e sudeste, respectivamente. De 2000 a 2005 foram reportados 183 casos de LV e 16162 de LC, tendo a leishmaniose canina (Lcan) uma prevalência global de 15,8% (Dujardin *et al.*, 2007). Na Síria foi já detectada uma elevada percentagem de cães infectados por *L. infantum* (Dereure *et al.*, 1998), e nos distritos de Aleppo e Damasco *L. tropica* e *L. major* são, respectivamente, endémicas (Khiami *et al.*, 1991; Tayeh *et al.*, 1997). Em Israel, a maioria dos casos de LC tem como agente etiológico *L. major*. Recentemente foi descrito um novo foco de LC causada por *L. tropica* em Tiberias e nas regiões do Norte de Israel (Shani-Adir *et al.*, 2005). Na Tunísia, ocorrem casos de LC em focos antigos, devido a *L. major* e *L. infantum* (Zakraoui *et al.*, 1995; Chaffai *et al.*, 1988). Na região Norte, ao contrário do carácter esporádico da LC causada por *L. infantum* MON-1 e MON-24, tem-se registado um aumento considerável no número de casos (Aoun *et al.*, 2000; Belhadj *et al.*, 2003). Desde 1995 que em Taza, no Norte de Marrocos, se começou a observar um foco emergente de LC; até então a leishmaniose ocorria

essencialmente no Sul do país causada por *L. major* e *L. tropica* (Guessous-Idrissi *et al.*, 1997). Num estudo efectuado no Líbano, entre 1993 e 1997, observou-se uma prevalência de LC de 0.18% em áreas rurais e de 0.41% em áreas urbanas, enquanto que a LV era praticamente inexistente em ambas as zonas (Nuwayri-Salti *et al.*, 2000).

No continente Europeu, a Espanha, França, Itália e Portugal, apresentam um quadro semelhante relativamente às leishmanioses. Tanto as populações humanas como caninas são infectadas por *L. infantum*. Nestes países a LV é mais frequente que a LC. Em Espanha, a distribuição geográfica de *L. infantum* não é homogénea, no entanto a transmissão parece atingir todo o país excepto a região noroeste e as ilhas Canárias. Algumas regiões de Espanha são consideradas focos endémicos como é o caso da Costa do Sol e Ilhas Baleares. Neste país o parasita apresenta um elevado polimorfismo enzimático, no entanto, o zimodeme MON-1 surge com maior frequência, ocorrendo em 42 % dos imunocompetentes e em 44,8% dos imunodeprimidos (Chicharro *et al.*, 2003). Relativamente aos países do Sul da Europa, Espanha é o país onde estão declarados a maioria dos casos de co-infecção com VIH (57,9%), sendo as cidades com mais casos Barcelona, Granada, Madrid, Sevilha e Palma de Maiorca (Desjeux & Alvar, 2003). O cão é considerado o principal reservatório doméstico. Um estudo relativamente recente realizado na Ilha de Maiorca (Baleares) revelou uma prevalência de Lcan de 67%, tendo por base os animais seropositivos e/ou os animais com medula positiva pela técnica de PCR (Solano-Gallego *et al.*, 2001).

Em França, a leishmaniose causada por *L. infantum* ocorre no Sul do país em cinco focos endémicos: Pirinéus Orientais, Cévennes, Provença, Costa Azul e na Ilha de Córsega. Em todos eles, à excepção dos Pirinéus orientais onde a LC ocorre na maioria dos casos, a LV é a forma predominante da doença. No país foram identificados diversos zimodemes (MON-1, MON-11, MON-24, MON-29, MON-33, MON-34 e MON-108), no entanto, o zimodeme MON-1 foi identificado em 88,48 % no total dos isolados (Pratlong *et al.*, 2004). De 1995 a 1998 observou-se um aumento do número de casos de co-infecção *Leishmania*/VIH, nomeadamente na Provença, Costa Azul e Pirineus Orientais, observando-se uma distribuição mais rural e maior dispersão nestas regiões (WHO, 2000). Presentemente, nos Alpes Marítimos, encontra-se a Lcan com prevalência de 7% a 10%. Relativamente à leishmaniose humana os casos são esporádicos e frequentemente em indivíduos VIH positivos (31%) (Marty *et al.*, 2007).

Em Itália, tal como noutros países da bacia mediterrânica, a leishmaniose é causada por *L. infantum* e essencialmente visceral. A LV tem vindo a aumentar nas crianças e em adultos imunocompetentes. Um estudo epidemiológico infantil realizado nos últimos 15 anos, na região de Campania, revelou 255 casos, dos quais 134 foram tipados como zimodeme MON-1 (55%) e zimodeme MON-72 (45%) (di Martino *et al.*, 2004). Por outro lado, com a introdução da terapia HAART, a incidência anual da LV teve uma marcada redução no número de doentes VIH+ (Russo *et al.*, 2003). A Lcan é endémica em diversas regiões de Itália nomeadamente no centro e sul, onde a prevalência atinge os 48% (Paradies *et al.*, 2006). Existe actualmente um novo foco emergente de LV no Norte para além dos Alpes (Maroli *et al.*, 2007).

Em Portugal, a leishmaniose também é endémica, sendo causada por *L. infantum* e predominantemente visceral. A sua situação actual será abordada no sub-capítulo seguinte (1.6).

De 1993 e 1995 foi diagnosticada leishmaniose importada em 132 cães na Alemanha. Destes, 35 terão sido infectados em viagens para países endémicos e 97 foram adquiridos em Espanha, França, Portugal ou Turquia (Gothe *et al.*, 1997).

1.6 Leishmaniose em Portugal

A LV em Portugal é conhecida desde 1910, quando foi descrito o primeiro caso, por Dionísio Alvares (1910), numa criança de nove anos de idade, residente em Lisboa. Só em 1943 foi descrito o primeiro caso de LC num adulto da região do Alto Douro (Tavares, 1943). Face ao aumento da incidência de leishmaniose em todo o país na década de 50, a LV passou a fazer parte das doenças de notificação obrigatória (Ramos & Farinhote, 1952; Azevedo, 1960). As campanhas de luta contra os vectores da malária, com a aplicação de insecticidas clorados, na década de 50, provocaram também a diminuição da densidade flebotomínica, dando origem a um decréscimo da LV principalmente no Sul de Portugal, com a extinção de alguns focos endémicos, nomeadamente o de Alcácer do Sal (Azevedo, 1960). A partir de 1970, a incidência da leishmaniose aumentou na zona geográfica do Alto Douro e propagou-se a outras regiões (Abranches & Pires, 1980, Pires *et al.*, 1992). Nas décadas de 80 e 90 foram

identificados no país três focos endémicos de LV: a região do Alto Douro, a região metropolitana de Lisboa (RML) e a região do Algarve (Campino *et al.*, 1995).

De acordo com as notificações oficiais, nos últimos anos, tem-se observado um decréscimo da doença na população humana portuguesa. Dados recentes da Direcção Geral de Saúde (DGS) indicam que, de 2000 a 2006, o número de casos notificados de leishmaniose humana foi de 86, tendo variado entre 7 a 21 casos/ano, sendo que a maioria dos casos notificados provêm da região de Lisboa e Vale do Tejo. Nestes últimos anos não tem sido notificada leishmaniose no Algarve e apenas um número reduzido de casos no Norte de Portugal (DGS, www.dgs.pt). De acordo com o diagnóstico que é efectuado na UEI de leishmanioses do IHMT, estes valores parecem estar muito subestimados, uma vez que o número de casos diagnosticados na Unidade é superior ao que tem sido oficialmente declarado. Desde 2000 até 2006, registou-se um total de 152 casos diagnosticados, tendo o número de casos por ano variado entre 14 e 31 (Figura 1.2). No entanto, apenas 26% correspondem a indivíduos imunocompetentes e, nestes, predominantemente em crianças até aos 2 anos (Figura 1.3). Desde o começo dos anos noventa, que a leishmaniose humana se tem tornado bastante relevante devido ao elevado número de adultos co-infectados com o VIH, e este facto verificou-se particularmente na RML. Os dados obtidos na UEI de leishmanioses apontam, na última década, para um aumento do número de casos de LV, de um modo especial em adultos imunocomprometidos com SIDA que contraria o observado noutros países da Europa. Por outro lado a LC localizada, embora ocorra num número de casos muito mais reduzido, quando comparado com a LV, tem sido diagnosticada em indivíduos imunocompetentes, tanto em crianças como em adultos, e mais raramente em indivíduos imunocomprometidos, estando muitas vezes associada a recidivas de episódios de LV (Manso *et al.*, 1998; Campino *et al.*, 2005; Campino *et al.*, 2006; Catorze *et al.*, 2006). Não obstante, os casos de LC descritos na literatura serem raros, a incidência da forma cutânea da doença é bastante superior relativamente aos casos descritos.

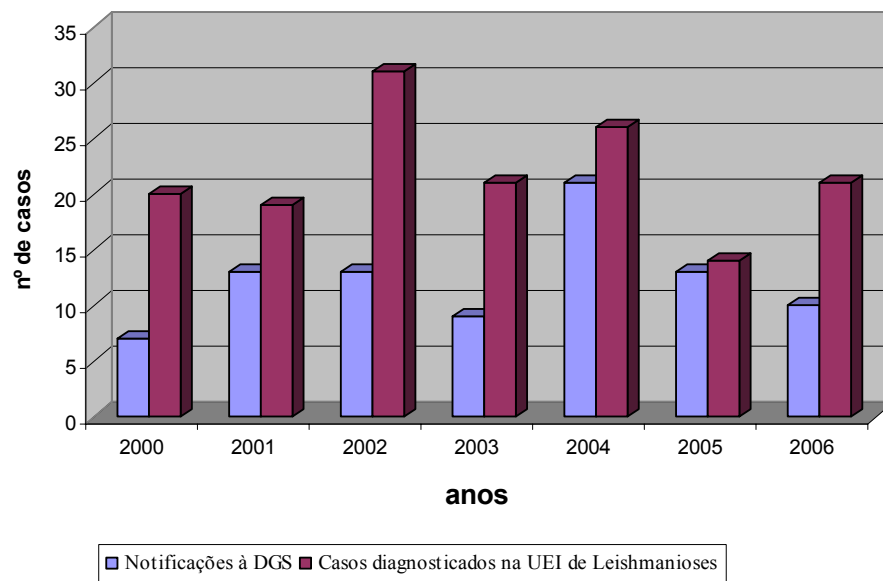


Figura 1.2. Casos de LV notificados à DGS e diagnosticados na UEI de Leishmanioses, IHMT, no período compreendido entre 2000 e 2006.

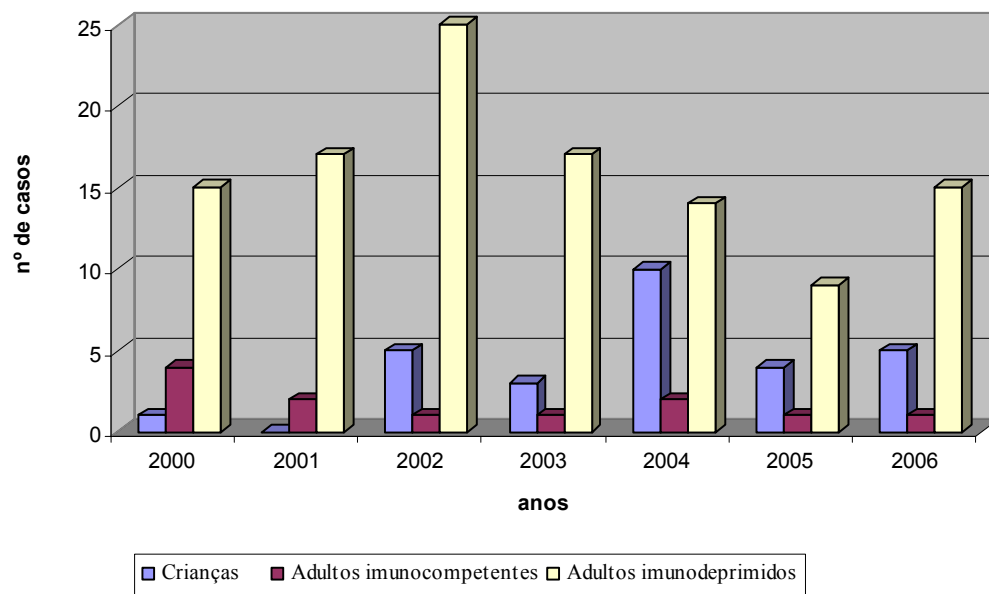


Figura 1.3. Casos de LV, de acordo com o estado imunitário, diagnosticados na UEI de Leishmanioses, IHMT, no período compreendido entre 2000 e 2006.

À semelhança dos restantes países da bacia mediterrânica, em Portugal a leishmaniose é uma zoonose que tem o cão como principal reservatório da doença, sendo a Lcan uma zoonose potencialmente fatal para os cães.

Tal como na LV, nas décadas de 80 e 90, foram também identificadas regiões endémicas de Lcan, como a Região de Trás-os-Montes e Alto Douro, a RML e o Algarve (Abranches, 1984; Abranches *et al.*, 1987; Abranches *et al.*, 1992; Sampaio-Silva *et al.*, 1993; Campino *et al.*, 1995). Presentemente, para além das regiões consideradas endémicas, têm sido detectados casos esporádicos de Lcan em quase todo o território continental. Dados recentes parecem indicar um aumento da prevalência da Lcan na região do Alto Douro, uma vez que na década de 80 os valores se situavam entre 10% e os 12,4%, chegando a atingir 37,8% no concelho de Alijó (Abranches *et al.*, 1992), em 2004 um estudo de seroprevalência neste mesmo concelho revelou uma prevalência total de 18,7%, sendo que numa das freguesias os valores chegaram a 81,1% Cardoso *et al.*, (2004). Nos últimos anos, está a assistir-se também a um aumento da Lcan na RML, uma vez que também na década de oitenta um inquérito sero-epidemiológico realizado por Abranches *et al.*, (1987), revelou uma prevalência de 5,5% e, recentemente, num estudo efectuado por Cortes *et al.*, (2007), observou-se uma prevalência de 19,2%.

As estirpes portuguesas isoladas foram identificadas por Electroforese Enzimática de Multilocus (“multilocus enzyme electrophoresis”, MLEE) ou tipagem isoenzimática, efectuada num dos Centros de Referência da OMS. A identificação por tipagem isoenzimática começou a ser utilizada em Portugal no início da década de 80, com a colaboração do “Centre National de Référence des *Leishmania*, Université de Montpellier”, França, sendo os isolados designados por “MON” devido ao local onde é efectuada a tipagem (Montpellier). *L. infantum* zimodeme MON-1 é o zimodeme mais frequentemente identificado em Portugal, em 97% dos isolados, de Norte a Sul do país, como causa da LV e o único identificado na LCan (Campino *et al.*, 2006). No entanto, foi descrito no Alto Douro um caso isolado de *L. infantum* MON-98 num cão (Cardoso *et al.*, 2002). O zimodeme MON-1 foi também isolado a partir do vector *Ph. ariasi* (Pires *et al.*, 1991). Foram igualmente identificados outros zimodemes de *L. infantum* nomeadamente, MON-24 em dois flebótomos *Ph. ariasi* da região do Alto Douro (Pires *et al.*, 1991) e num indivíduo co-infectado da RML (Campino *et al.*, 1994a), MON-29 e

MON-80 também em indivíduos co-infectados da RML (Campino *et al.*, 2006). Foi também isolada *L. donovani* MON-18, agente etiológico da LV na Etiópia e Sudão, de um doente DDE e co-infectado, que nunca tinha saído do país (Campino *et al.*, 1994b). Recentemente foram identificados dois híbridos de espécies filogeneticamente distantes, *L. infantum* e *L. major*, em dois doentes co-infectados da RML (Ravel *et al.*, 2006).

Depois de um primeiro isolamento de *L. infantum* MON-1 a partir de um caso numa criança com LC proveniente da RML (Campino *et al.*, 2005), foi recentemente descrito um outro caso semelhante a PKDL num adulto infectado com o VIH, com sucessivas recidivas de LV, da mesma região, sendo o agente causal identificado como *L. infantum* MON-1 (Catorze *et al.*, 2006).

1.7 Epidemiologia molecular

A epidemiologia molecular é um termo usado comumente para estudos moleculares descritivos de populações de patógenos utilizando abordagens filogenéticas ou de genética de populações. No entanto, no caso das leishmanioses, o seu principal objectivo deve ser o de apoiar estudos sobre a distribuição, determinantes e controlo da doença em grupos de populações, uma vez que este é o cerne da epidemiologia (Schönian *et al.*, 2008). Os maiores desafios para uma abordagem de epidemiologia molecular na epidemiologia de uma doença infecciosa, são a comunicação entre os especialistas moleculares e não-moleculares, uma amostragem apropriada e standardização de métodos moleculares e bases de dados.

A epidemiologia das leishmanioses depende da espécie ou sub-espécie implicada na transmissão da infecção. A correcta identificação da espécie do parasita responsável é importante para se poder delinear uma estratégia de controlo e tratamento apropriado (Salotra *et al.*, 2001; Schallig & Oskam, 2002). As ferramentas moleculares são, presentemente, cada vez mais aplicadas para responderem a questões relacionadas com a epidemiologia e a transmissão dos parasitas. A epidemiologia molecular, considerada um ramo da epidemiologia, pode proporcionar um melhor conhecimento das infecções, não só dos agentes que estão na sua origem, mas também uma contribuição para as relações com a sua ecologia e dinâmica de transmissão.

Desde o aparecimento da biologia molecular, os avanços tecnológicos têm contribuído para um conhecimento aprofundado da diversidade nas populações de parasitas. Nos tripanossomatídeos tem sido observada correlação entre as distâncias genéticas estimadas pelos diferentes métodos moleculares, como análise de isoenzimas por tipagem de sequências multilocus (“multilocus sequence typing”, MLST), hidrólise do DNA amplificado por endonucleases de restrição (“restriction fragment length polymorphism”, RFLP) e amplificação de DNA polimórfico de distribuição aleatória (“random amplification of polymorphic DNA”, RAPD). As variações encontradas são devidas a mutações pontuais, sendo a sua transmissão essencialmente clonal. No entanto pode cair-se no risco de redundância com a informação obtida pelos diferentes métodos (Dujardin *et al.*, 2002). Este risco pode ser obviado utilizando diferenças na taxa de mutação, ou seja, escolhendo os marcadores moleculares apropriados. Por exemplo, as sequências dos espaçadores internos transcritos (“internal transcribed spacers”, ITS) no operão ribossomal evoluem mais rapidamente que os próprios genes (genes que codificam para a sub-unidade pequena e grande do RNA ribossomal (RNAr)), o que permite uma discriminação a diferentes níveis taxonómicos. Pode-se também analisar, para além das mutações pontuais, como é que as próprias sequências se reorganizam, ou seja, os estudos dos rearranjos de genes podem fornecer novas informações sobre a diversidade dos parasitas (Dujardin *et al.*, 2002).

Inicialmente as diferentes espécies de *Leishmania* eram classificadas através de critérios extrínsecos tais como geográficos, clínicos, biológicos e epidemiológicos. Desde o final da década de oitenta iniciou-se uma classificação baseada em características bioquímicas do parasita, a análise isoenzimática ou MLEE, considerada até ao presente como a técnica taxonómica mais útil em termos epidemiológicos. Actualmente a análise isoenzimática é ainda considerada como o método de referência para a identificação das diferentes estirpes de *Leishmania*, sendo realizada em laboratórios especializados, considerados como Centros de Referência, de forma a poderem identificar novos zimodemes, de acordo com a sua nomenclatura (Gramiccia *et al.*, 1992; Pratlong *et al.*, 2001; Martin-Sanchez *et al.*, 2004). Contudo, e apesar de amplamente aceite, a tipagem isoenzimática não identifica de forma eficaz a diversidade genética dos parasitas pois substituições nucleotídicas que não alterem a composição aminoacídica permanecem indetectáveis. De igual modo, modificações na composição

de aminoácidos que não alterem a mobilidade electroforética podem também não ser detectadas. Por outro lado, modificações pós-transcripcionais podem alterar a mobilidade electroforética de genótipos idênticos (Lewin *et al.*, 2002). Para além das limitações anteriormente referidas, é também uma técnica morosa e dispendiosa, estando sujeita a contaminações dos grandes volumes de culturas dos parasitas *in vitro* necessários para a sua análise. A tipagem isoenzimática pode subestimar a variabilidade genética dos parasitas, apostando-se cada vez mais nas características genéticas para a identificação e classificação dos parasitas de *Leishmania* complementando-se a análise isoenzimática com métodos de biologia molecular baseados na reacção da polimerase em cadeia (“polymerase chain reaction”, PCR) com alvos moleculares polimórficos e com elevado poder discriminatório (Quispe-Tintaya *et al.*, 2005).

As técnicas baseadas no DNA têm sido aplicadas para identificação e estudos de variabilidade genética de isolados de *Leishmania* ao nível do género, espécie ou mesmo da estirpe envolvida na infecção. Os estudos envolvendo PCR, sequenciação ou outra abordagem molecular, requerem a selecção de regiões do genoma apropriadas que têm que ser seleccionadas de acordo com o seu grau de polimorfismo. Sequências que codificam proteínas vitais ou RNAs são úteis para comparações entre taxa relativamente distantes, uma vez que são altamente conservados. Por outro lado, genes que codificam para proteínas antigénicas variam consideravelmente. De igual modo, as regiões intergénicas dos genes de RNAr possuem domínios variáveis podendo diferenciar genomas ao nível de género ou espécie.

Metodologias com base no PCR têm sido aplicadas com sequências iniciadoras específicas para espécie utilizando diferentes alvos moleculares como os ITS do RNAr (El Tai *et al.*, 2001; Schonian *et al.*, 2001; Maurício *et al.*, 2004), os microssatélites (Bulle *et al.*, 2002; Khuls *et al.*, 2005; Schwenkenbecher *et al.*, 2004; Ochsenreither *et al.*, 2006), os mini-exões (Katakura *et al.*, 1998), sequências variáveis do gene da pequena sub-unidade do RNA (van Eys *et al.*, 1992), genes que codificam para diferentes proteínas (Victoir *et al.*, 1998; Maurício *et al.*, 1999) e DNA cinetoplastideal (Smyth *et al.*, 1992; Chicharro *et al.*, 2002; Cortes *et al.*, 2004). A utilização de marcadores de DNA anónimos é outra abordagem que tem sido aplicada à diferenciação de estirpes de *Leishmania* (Lewin *et al.*, 2002). Têm sido observados elevados níveis de variação inter e intra-específicas nas espécies de *Leishmania* (*Viannia*) no Novo Mundo

por amplificação e restrição dos ITS (Cupolillo *et al.*, 1995). A aplicação da técnica de polimorfismo conformacional de cadeia simples (“single stranded conformation polymorfism”, SSCP) e de RFLP, possibilitam a detecção de variação entre isolados de *Leishmania*, tal como foi observado em isolados sudaneses de *L. tropica* (Schönian *et al.*, 2001). A sequenciação total de genes ou de produtos de PCR de uma sequência de um determinado gene é outra abordagem utilizada como método de tipagem e em estudos de genética de populações. No entanto, poderá haver necessidade de clonagem se existirem variantes da sequência, como por exemplo existência de diferentes tamanhos e heterogeneidade em regiões hipervariáveis de DNA. Apesar de ser a metodologia mais informativa, poder-se-á tornar trabalhosa, demorada e dispendiosa.

Recentemente a análise de polimorfismos de tamanho de regiões do genoma contendo microssatélites tem-se revelado uma ferramenta importante em estudos genéticos e populacionais, bem como epidemiológicos, num elevado número de espécies diferentes (Orti *et al.*, 1997; Blair *et al.*, 2002). Os microssatélites são pequenas sequências, compostas por motivos de nucleótidos de 1 a 6 pb, ubiquamente distribuídas pelos genomas dos organismos eucariotas, repetidas sucessivamente, não transcritas e codominantes (Ochsenreither *et al.*, 2006). Os microssatélites podem ser encontrados em qualquer parte dos genomas, tanto em regiões codificantes como não codificantes (Toth *et al.*, 2000). A sua taxa de mutação é 5 a 6 vezes superior à do restante DNA. Os *loci* de microssatélites apresentam polimorfismos essencialmente devido a variações de tamanho nos alelos. O deslizamento durante a replicação do DNA é o mecanismo responsável pela formação de alterações de tamanho nos *loci*. O mecanismo mais comum de mutação dos microssatélites é baseado no modelo de mutação passo-a-passo (“stepwise mutation model”, SMM), em que uma unidade de repetição tanto pode ser adicionada como perdida em resultado de uma mutação, ou seja neste modelo quando se efectuam testes estatísticos da estrutura de uma população, o tamanho dos alelos é importante. Outro mecanismo mais complexo pode estar envolvido no processo de mutação dos microssatélites, o modelo de alelos infinitos (“infinite alleles model”, IAM), em que cada mutação pode criar qualquer novo alelo aleatoriamente; neste modelo o tamanho dos alelos não é importante (Ellengren, 2000). A variação nos *loci* individuais pode ser facilmente identificada após amplificação por PCR. No entanto, a escolha do número de microssatélites a avaliar é um factor

importante, uma vez que o número de microssatélites influencia as estimativas das distâncias genéticas e a construção de filogenias (Koskinen *et al.*, 2004). Ochsenreither *et al.*, (2006) aponta a necessidade de se avaliar um painel de 10 a 20 marcadores para cada espécie de *Leishmania*.

O parasita *Leishmania* é relativamente rico em microssatélites (Rossi *et al.*, 1994). Diversos estudos têm sido desenvolvidos, utilizando este tipo de marcadores, nomeadamente aplicados à variação inter e intra específica de *Leishmania* sub-género *Viannia*, *L. tropica*, complexo *L. donovani* e *L. infantum* (Russel *et al.*, 1999; Schwenkenbecher *et al.*, 2004; Khuls *et al.*, 2005; Bulle *et al.*, 2002).

Tal como noutras áreas da ciência, há diversos factores que têm que ser considerados antes de se testarem hipóteses e de se efectuarem conclusões significativas de um estudo de epidemiologia molecular. Assim, há que ter uma amostra representativa, o mais completa possível, fazer escolha adequada dos marcadores, de acordo com o grau de variação genética, tentar usar mais do que um *locus* e testá-los para a neutralidade, bem como explorar os dados analisando-os de diferentes formas (Constantine, 2003).

1.8 Métodos de diagnóstico na leishmaniose

O diagnóstico definitivo das leishmanioses é efectuado pela detecção do agente causal, de um modo geral nos órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocítico ou em lesões de pele, no caso de se tratar de LV ou de LC, respectivamente. No entanto, a existência de um valor de anticorpos igual ou superior ao limiar de significância traduz a presença de infecção por *Leishmania*, particularmente no caso da LV, em doentes imunocompetentes. Podem-se, assim, considerar dois tipos de diagnóstico laboratorial: diagnóstico imunológico, em que se determina a presença ou o valor de anticorpos anti-*Leishmania* ou de antigénios, e diagnóstico parasitológico, em que se efectua a pesquisa do parasita nos órgãos infectados por observação microscópica ou cultura, ou a detecção do DNA do parasita. De um modo geral, os testes de diagnóstico laboratorial são os mesmos para a leishmaniose humana e canina.

1.8.1 Diagnóstico imunológico

Nas últimas três décadas registou-se um progresso importante no domínio das técnicas seroimunológicas, as quais se revelaram um instrumento indispensável no estudo das doenças infecciosas, nomeadamente da LV, quer humana quer canina (Campino, 1998).

Diferentes testes serológicos são presentemente utilizados para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, nomeadamente o teste de imunofluorescência indirecta (IFI), contraimmunoelectroforese (CIE), teste de aglutinação directa (DAT), “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA), teste imunocromatográfico rK39, entre outros (Abranches, 1984; Campino, 1991; Harith *et al.*, 1986; Maurício *et al.*, 1995; Badaró *et al.*, 1996). A sensibilidade e especificidade destes testes é, de um modo geral, elevada nos adultos imunocompetentes (Mittal *et al.*, 1991; Sundar *et al.*, 2006). No entanto, em indivíduos imunocomprometidos, nomeadamente co-infectados com o VIH, estes valores são mais reduzidos, tendo já sido reportados casos de indivíduos com LV e co-infectados com o VIH que são seronegativos para anticorpos anti-*Leishmania* (Gradoni *et al.*, 1993; Alvar *et al.*, 1997). A OMS recomenda, por isso, a utilização de dois ou mais testes serológicos com fundamentos distintos, cujos antigénios devem ser recentemente preparados no laboratório, de forma a aumentar a sensibilidade do diagnóstico (WHO, 2000).

A técnica de IFI como meio de serodiagnóstico tem prosseguido desde 1963 (Oddo & Cascio, 1963) e continua a ser um método amplamente utilizado no diagnóstico de LV, devido à sua elevada sensibilidade e especificidade (Abranches, 1984; Singh & Sivakumar, 2003). A IFI permite detectar anticorpos específicos anti-*Leishmania* no soro. Os anticorpos surgem no início da infecção e tornam-se indetectáveis 6 a 9 meses após a cura, permitindo monitorizar a evolução da doença e da terapêutica. Como antigénios pode-se utilizar promastigotas ou amastigotas fixados a lâminas. A IFI apresenta uma relativa elevada especificidade (70-98%) e sensibilidade (55-96%), mas implica a aquisição de equipamento dispendioso assim como é uma técnica um pouco morosa, uma vez que implica a preparação prévia do antigénio (Singh

& Sivakumar, 2003). No entanto, em indivíduos imunodeprimidos, já foram reportados valores de sensibilidades bem mais reduzidos (Campino *et al.*, 1997).

A técnica de CIE apresenta a vantagem de permitir uma resposta menos demorada e utilizar quantidades reduzidas de antígeno, apresentando uma elevada sensibilidade (83,3%) e especificidade (96,3%) nos soros humanos (de imunocompetentes) e 100% em soros caninos (Campino, 1991).

A técnica de micro-ELISA é usada no imunodiagnóstico de quase todas as doenças infecciosas incluindo a leishmaniose, desenvolvida a partir da técnica inicial de ELISA, descrita por Engvall & Perlmann (1972). É muito sensível mas a sua especificidade depende do antígeno usado. O mais vulgarmente utilizado é o antígeno total solúvel obtendo-se uma sensibilidade entre 80-100%. Nos pacientes com tuberculose, toxoplasmose e tripanosomose podem verificar-se reacções cruzadas (Kumar *et al.*, 2001; Sundar & Rai, 2002), apresentando também uma reprodutibilidade pouco satisfatória e uma má estabilidade dos reagentes (Maurício *et al.*, 1995). No entanto, pode ser de útil aplicação em estudos epidemiológicos, por permitir a análise simultânea de um número elevado de amostras.

O teste de DAT tem sido descrito para o diagnóstico da LV e Lcan. Utilizam-se microplacas onde se adiciona o soro em estudo e os promastigotas corados que funcionam como antígenos (Harrith *et al.*, 1986). A presença de aglutinação implica um resultado positivo. Vários estudos demonstraram valores de sensibilidade entre 90 e 100% e especificidade de 80 a 95% (Singh & Sivakumar, 2003). No entanto, a reprodutibilidade do método é afectada pelas variações entre diferentes lotes de antígeno e pelo facto de ser uma técnica semi-quantitativa, pelo que a leitura dos títulos no final da reacção é subjectiva e pode variar de ensaio para ensaio (Tavares *et al.*, 2003). Recentemente foi criado um teste de aglutinação rápido (“fast agglutination screening test”, FAST) para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* no soro e em sangue total colhido em papel de filtro (Hailu *et al.*, 2002). A sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade do FAST são idênticas às do DAT (Singh & Sivakumar, 2003).

Mais recentemente, um antígeno recombinante de uma proteína de 39 aminoácidos, designado por rK39, foi inicialmente utilizado num teste de ELISA (Singh *et al.*, 1995; Badaró *et al.*, 1996; Houghton *et al.*, 1998) e mais tarde num teste de

aplicação rápida (“dipstick”) (Sundar *et al.*, 1998). Ambos os testes têm sido reportados como altamente reactivos ao soro de casos de LV, LCan e leishmaniose dérmica pós-kala-azar, com sensibilidades e especificidades na ordem dos 90% (Badaró *et al.*, 1996; Sundar & Rai, 2002; Scalone *et al.*, 2002). Num estudo recente, foi comparada a validade de várias técnicas de diagnóstico, incluindo a IFI, DAT e “dipstick”, para o diagnóstico da LV em doentes do Nepal. Tendo como referência os exames parasitológicos, o teste do “rK39 dipstick” revelou uma sensibilidade de 87.4 %, bastante superior à da IFI (28.4%) e próximo do valor obtido por DAT (95.1%). Os autores concluíram que o DAT ou o “dipstick” podem substituir os testes parasitológicos no diagnóstico da LV no Nepal, possuindo o “dipstick” a vantagem de ser de mais fácil utilização (Boelaert *et al.*, 2004).

A detecção de antígenos de *Leishmania* na urina de indivíduos com LV foi realizada pela primeira vez por Kohanteb *et al.* (1987). O teste revelou uma sensibilidade de 96% e especificidade de 100% e os antígenos deixaram de ser detectados três semanas após tratamento, sugerindo que o teste possui um bom valor de prognóstico (Attar *et al.*, 2001; Sarkari *et al.*, 2002). A detecção de antígeno parece ser mais específica que os testes que se baseiam na detecção de anticorpos. Este método é útil para o diagnóstico da infecção nos casos em que há uma deficiente produção de anticorpos, como é o caso de pacientes com SIDA.

1.8.2 Diagnóstico parasitológico

Os métodos de diagnóstico parasitológico clássicos realizam-se através de exame directo ou cultural a partir de material biológico potencialmente infectado. O exame directo é efectuado através da pesquisa de formas amastigotas por observação microscópica de decalques ou esfregaços das amostras biológicas, essencialmente de medula óssea, gânglios linfáticos ou material de biópsia de lesões de pele, quer de humanos quer de cães (Dedet & Pratlong, 2003). A identificação das formas amastigotas requer um treino considerável, podendo a contagem variar de acordo com a experiência e habilidade do observador. Nas amostras com reduzido parasitismo é possível que não sejam visualizadas as formas amastigotas, mesmo com uma observação demorada. A sensibilidade da técnica de microscopia de esfregaços de

medula óssea é de 60-85%, este valor pode ser aumentado para 80-98% caso o material biológico seja proveniente de aspirado esplênico (Singh & Sivakumar, 2003; Sundar & Rai, 2002). No entanto, as punções esplênicas raramente são efectuadas no Ocidente devido aos riscos de hemorragias.

O exame cultural é mais sensível que o exame directo. Os meios geralmente usados são o meio de NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) e o meio “Schneider’s *Drosophila*”. As culturas além de serem morosas, podendo demorar cinco semanas até se obterem culturas positivas, estão sujeitas ao risco de contaminação bacteriana ou fúngica. A sensibilidade das culturas depende de vários factores como a viabilidade do parasita, as condições do meio e a experiência do técnico (Anders, 2003), apresentado geralmente valor mais elevado do que a observação microscópica.

O isolamento dos parasitas *Leishmania* em meio de cultura possibilita: (1) a identificação da estirpe por tipagem isoenzimática ou molecular; (2) a obtenção de um número suficientemente elevado de organismos para inoculações em infecções experimentais e para obtenção de antigénios; (3) estudos “in vitro” da eficiência de fármacos.

O xenodiagnóstico é outro processo de diagnóstico parasitológico que consiste na inoculação do material suspeito em animais de laboratório, como o hamster. Este método é raramente utilizado para diagnóstico, uma vez que podem ser necessários meses até à obtenção de um resultado

1.8.3 Técnicas moleculares aplicadas ao diagnóstico

A partir da década de 80 começaram a desenvolver-se diferentes técnicas moleculares para detecção de ácidos nucleicos do parasita para diagnóstico da leishmaniose, nomeadamente sondas de DNA total, utilizadas em “dot-blot”, “touch-blot” e hibridação *in situ*, no entanto, estas técnicas mostraram baixa especificidade (Meredith *et al.*, 1993; Schoone *et al.*, 1991).

A PCR é considerada uma ferramenta eficaz para o diagnóstico de várias doenças infecciosas, incluindo as leishmanioses. Este método permite a amplificação de sequências de DNA específicas do parasita, previamente seleccionadas. Nos últimos anos, têm sido realizados uma série de ensaios com a aplicação da técnica de PCR,

numa grande variedade de amostras clínicas, como biópsias de pele, aspirados de medula óssea, nódulos linfáticos e sangue periférico. A sensibilidade da PCR tem vindo a aumentar com o uso de sequências iniciadoras que amplificam sequências que possuem mais de uma cópia por célula. No caso da leishmaniose, essas sequências incluem, por exemplo, os genes do mini-exão (Katakura *et al.*, 1998), os genes que codificam para SSU rRNA, ou 16S rRNA (Van Eys *et al.*, 1992), sequências repetitivas do RNA nuclear (Piarroux *et al.*, 1993), os ITS (Schonian *et al.*, 2003) e o kDNA (Smyth *et al.*, 1992; Cortes *et al.*, 2004).

De entre os alvos moleculares mais amplamente aplicados ao diagnóstico da leishmaniose destacam-se os minicírculos do cinetoplasto e o gene que codifica para a 16S rRNA. Este gene foi sequenciado em mais de 100 espécies (citado em Van Eys *et al.*, 1992). A comparação das sequências do gene em humanos (hospedeiro), artrópodes (vector) e cinetoplastídeos (parasita) indica que apenas uma sequência de cerca de 800 pb situada na região central deste gene apresenta considerável heterologia (Dams *et al.*, 1988). O DNA nuclear contém cerca de 160 cópias do gene 16S rRNA e o citoplasma contém mais de 10^4 moléculas de 16S rRNA (Van Eys *et al.*, 1992). O kDNA possui características únicas: o parasita *Leishmania* possui um número limitado de classes de minicírculos (geralmente cerca de 10). Na maioria das espécies de *Leishmania*, cerca de 80% dos minicírculos pertencem a quatro, ou menos, classes principais, o que significa que cada classe é representada por um número elevado de cópias ($> 10^3$) disponíveis para amplificação por PCR ou hibridação com sondas (Barker, 1989). Dos cerca de 800 pb que constituem o minicírculo, cerca de 120 pb correspondem a uma região conservada e cerca de 680 a região variável que pode ser utilizada para a detecção e discriminação de espécies de *Leishmania* (Barker, 1987; Smyth *et al.*, 1992; Bozza *et al.*, 1995).

A técnica de PCR é cada vez mais utilizada e aceite como método de diagnóstico, já que detecta parasitas numa grande variedade de amostras e em todas as formas clínicas da doença (Andersen *et al.*, 1997, Minodier *et al.*, 1997, Campino *et al.*, 2000, Schallig & Oskam, 2002). Diversos estudos têm provado que a sensibilidade da PCR é superior à alcançada com técnicas de microscopia ou cultura (Martin-Sanchez *et al.*, 2002; Osman *et al.*, 1997; Rodrigues *et al.*, 2002) em especial em amostras de gânglios linfáticos ou de medula óssea de pacientes com LV (Schallig & Oskam, 2002).

A utilização da PCR em amostras de sangue periférico total ou impregnado em papel de filtro, também se tem mostrado eficiente como método de diagnóstico, nomeadamente em doentes imunocomprometidos (Mathis & Deplazes, 1995; Campino *et al.*, 2000). A possibilidade do uso do sangue impregnado em papel de filtro, muito tempo após a sua colheita, torna-se particularmente útil para estudos longitudinais e estudos epidemiológicos afastados do laboratório, uma vez que as amostras se conservam estáveis a +4°C por períodos de 2 a 36 meses (Campino *et al.*, 2000).

A PCR pode ainda facilitar o diagnóstico nos doentes com LC ou com LMC, bem como em doentes imunocomprometidos, que apresentam geralmente ausência ou baixos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* originando resultados serológicos maioritariamente negativos (Pirmez *et al.*, 1999; Schallig & Oskam, 2002).

Nos últimos 10 anos a técnica de PCR-ELISA tem sido desenvolvida para o diagnóstico da leishmaniose e quantificação absoluta dos parasitas, revelando elevada especificidade e sensibilidade (Pinero *et al.*, 1999; Martin-Sanchez *et al.*, 2001; Rolão *et al.*, 2004). Mas recentemente, aplicando a técnica de “Real-time” PCR, diversos ensaios têm sido realizados no âmbito da leishmaniose, quer para quantificação dos parasitas, quer para diferenciação das várias espécies (Nicolas *et al.*, 2002; Bossolasco *et al.*, 2003; Rolão *et al.*, 2004). Esta é uma técnica de rápida execução e que não requer manipulação pós-PCR, evitando potenciais contaminações com produtos amplificados, mostrando-se promissora na aplicação ao diagnóstico.

CAPÍTULO 2

INQUÉRITO DE LEISHMANIOSE CANINA

2. Inquérito de leishmaniose canina

2.1 Introdução

Nos países do Sul da Europa e, nomeadamente em Portugal, a leishmaniose, causada por *L. infantum*, é considerada uma zoonose, tendo como principal reservatório o cão (*Canis familiaris*, L., 1785). Esta parasitose que tem sido considerada uma doença rural, tem-se revelado nas últimas décadas cada vez mais prevalente em áreas urbanas. O aumento do número de casos em áreas urbanas e peri-urbanas está relacionado com a urbanização de focos zoonóticos naturais (Campino, 2002). Os animais domésticos, de um modo especial os cães, são, na sociedade moderna, uma presença frequente em muitos lares, contribuindo para o bem-estar físico, emocional e social dos donos. Estes animais estão frequentemente mantidos em quintais ou jardins que podem constituir bons habitats para o vector que é preferencialmente zoofílico. Por outro lado, o desenvolvimento urbano mal planeado pode levar ao aumento de resíduos sólidos e condições higieno-sanitárias deficientes, atraindo cães vadios que constituem um potencial reservatório do parasita, contribuindo para o aumento e dispersão da leishmaniose (Campino, 2002; Cortes *et al.*, 2007). O ciclo de transmissão doméstico/peridoméstico pode incluir cães de companhia, cães de guarda ou vadios. O facto dos animais estarem infectados não significa que tenham doença activa, alguns conseguem controlar o parasita e, consequentemente, não evoluem para a doença durante anos ou mesmo durante toda a vida, mantendo-se assintomáticos (Moreno & Alvar, 2002). Diversos estudos têm sugerido que os cães portadores assintomáticos podem transmitir os parasitas aos vectores (Molina *et al.*, 1994), contribuindo assim para a disseminação da infecção entre estes animais e destes para o Homem, tornando-se um problema de Saúde Pública.

A leishmaniose no cão caracteriza-se por ser um processo crónico que evolui, de um modo geral, com manifestação de adenopatias, dermatites, onicogrifose, perda de peso, caquexia, epistaxis e produção elevada de anticorpos (Semião-Santos *et al.*, 1995).

Inúmeros estudos têm descrito a ocorrência de leishmaniose canina (Lcan) em

diversos países da bacia mediterrânica, com prevalências que variam entre 7,8% e 67% (Fisa *et al.*, 1999; Sideris *et al.*, 1999; Solano-Gallego, 2001; Paradies *et al.*, 2006; Miró *et al.*, 2007). Em Portugal, têm sido efectuados diversos rastreios epidemiológicos de seroprevalência da Lcan, mostrando a existência de regiões endémicas, como referido anteriormente (Capítulo 1.6). No período compreendido entre 1981 e 1986, foram estudados 1899 cães, provenientes da região metropolitana de Lisboa (RML) (Abranches *et al.*, 1987). Aquele inquérito epidemiológico canino revelou uma seroprevalência de 8,8% na área rural e 3,8 % na área urbana. Duas décadas depois foi realizado um rastreio epidemiológico canino englobando áreas rurais e urbanas.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Área do inquérito

A RML é uma área bastante heterogénea. Junto à cidade de Lisboa encontram-se zonas periféricas suburbanas, onde predominam as “povoações dormitório” com alguns bairros mais carenciados, quer a Norte quer a Sul do Tejo. A região estudada englobou cinco concelhos dos distritos de Lisboa e Setúbal: Lisboa, Loures, Sintra, Cascais e Seixal (Figura 2.1). A zona estudada abrangeu uma área de 165,9 Km² de superfície com uma população de aproximadamente 1.448.419 habitantes (INE, censos 2001). Algumas freguesias dos concelhos estudados, nomeadamente Loures, englobam áreas agrícolas e, outras, frentes ribeirinhas, como no caso do Seixal. Os locais foram seleccionados por neles se conhecerem casos recentes de leishmaniose humana ou canina.

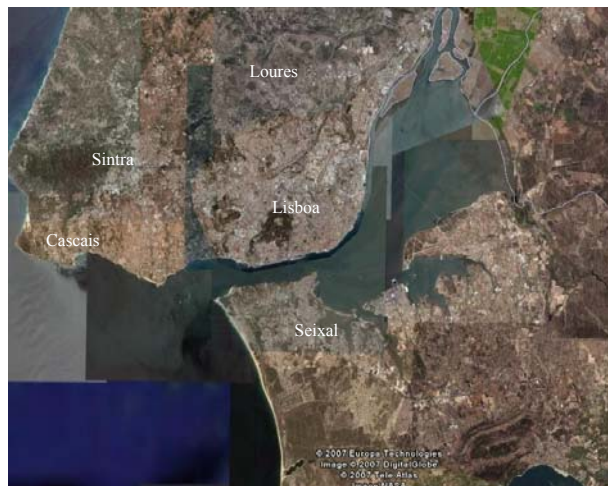


Figura 2.1. Distribuição geográfica das áreas em estudo nos Distritos de Lisboa e Setúbal (imagem de satélite captada com o “software” Google Earth).

2.2.2 Animais estudados

No período compreendido entre Dezembro de 2002 e Dezembro de 2003 foram estudados 374 cães de diferentes idades e raças. Os animais estudados incluem dois grupos: um grupo de 277 com dono (cães domésticos) e outro grupo de 97 sem dono (cães vadios) provenientes dos cinco concelhos anteriormente referidos, e distribuídos de acordo com o gráfico da Figura 2.2.

As amostras biológicas foram obtidas por duas vias:

- enviadas para o nosso laboratório por Médicos Veterinários de Clínicas da área em estudo;
- deslocação ao local, no caso dos canis municipais de Loures, Queluz e Seixal.

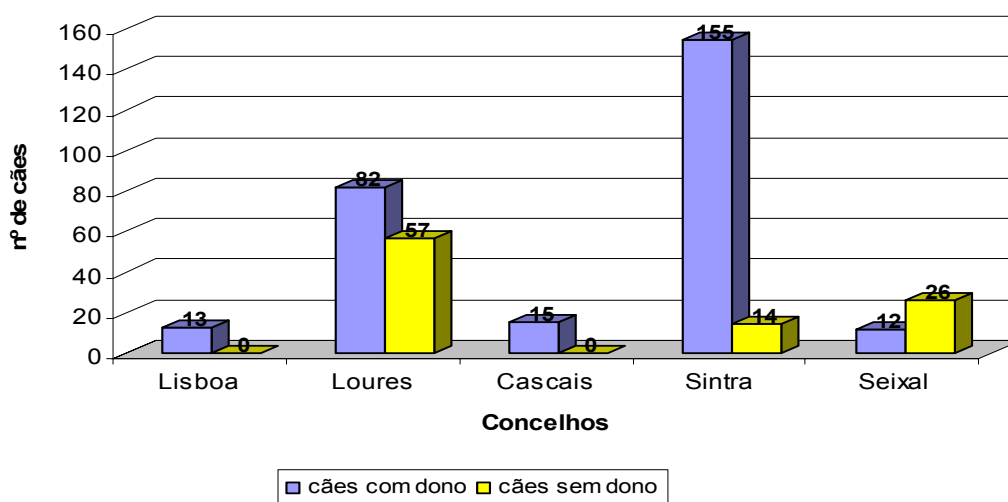


Figura 2.2. Distribuição dos dois grupos de cães estudados (com dono e sem dono) nos diferentes concelhos.

Considerámos que os animais com três ou mais sinais clínicos compatíveis com a doença eram classificados como sintomáticos. Os sinais clínicos considerados foram: emagrecimento, adenopatias, lesões dermatológicas (alopécia, pêlo baço, dermatite, hiperqueratose), onicogrifose, lesões oculares e hepatoesplenomegalia. Foram considerados como infectados os cães com duas reacções serológicas positivas ou exame cultural positivo.

A observação clínica dos animais bem como a colheita do material biológico foi realizada por um Médico Veterinário da nossa equipa.

2.2.3 Diagnóstico seroimunológico

Foi efectuada colheita de sangue em tubo seco de cada animal, e posterior separação do soro para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*. Foram utilizadas as técnicas de Imunofluorescência indirecta (IFI) e de Contraimuno-electroforese (CIE), uma vez que o diagnóstico serológico deve ter em conta os resultados de duas técnicas com fundamentos diferentes (Campino, 2002). Os testes serológicos foram efectuados em simultâneo com soros controlo, positivo e negativo.

2.2.3.1 Imunofluorescência indirecta

Na reacção de IFI, os anticorpos presentes no soro ligam-se aos antígenos somáticos dos parasitas fixados numa lâmina (antígeno figurado). Em seguida adiciona-se um anti-anticorpo marcado com o fluorocromo isocianato de fluoresceína, que se liga aos anticorpos do soro em estudo. A semi-quantificação do teor de anticorpos faz-se através da diluição dos soros. O título de anticorpos (imunoglobulinas totais) anti-parasita corresponde à maior diluição de soro em que foi observada fluorescência.

A preparação do antígeno figurado e o procedimento da técnica de IFI foram efectuados de acordo com Campino (1991). Consideraram-se como positivos os soros com títulos (ou diluições) iguais ou superiores a 1:64.

2.2.3.2 Contraimuno-electroforese

A CIE é um método de detecção de anticorpos que pode facilmente ser aplicado num inquérito epidemiológico, pela sua simples execução, elevada sensibilidade e baixo custo (Mansueto *et al.*, 1982; Maia *et al.*, 2007). O anticorpo e o antígeno, colocados em extremidades opostas têm uma migração convergente num suporte de acetato de gelose, a pH 8,2 e submetidos a um campo eléctrico. O anticorpo move-se em direcção ao cátodo devido a uma forte corrente electro-endosmótica e o antígeno, carregado negativamente, move-se em direcção ao ânodo; quando se encontram formam um arco de precipitação. Esta técnica é também designada por electroimunodifusão. A preparação do antígeno solúvel foi efectuada de acordo com Campino *et al.* (1998) e o procedimento da técnica de acordo com Campino (1991). Consideraram-se como positivos os soros que revelaram, pelo menos, um arco de precipitação.

2.2.4 Diagnóstico parasitológico

Nos cães com dono que apresentavam suspeita clínica de leishmaniose, foi efectuada biópsia aspirativa do gânglio poplíteo. Nos cães sacrificados nos canis municipais, foi efectuada a colheita *post-mortem* de material biológico nomeadamente: medula, baço, fígado, gânglio linfático e pele. Cada espécimen biológico de medula

óssea (cerca de 30 µl), de gânglio poplíteo (cerca de 30 µl), de pele (cerca de 3 mm² de lesão recolhida em NaCl 0,9% estéril), de baço ou fígado (aproximadamente 50 mg), foi inoculada assepticamente em meio bifásico NNN (“Nicolle-Novy-McNeal”) com 500 µl de NaCl 0,9% contendo 600U Penicilina G sódica (Sigma, ST. Louis, USA) por ml de meio, e posteriormente mantidas em estufa refrigerada a +24°C, sendo observadas e transferidas semanalmente para novos meios de NNN. As culturas negativas foram mantidas até cinco semanas pós-inoculação.

2.2.5 Identificação isoenzimática de estirpes

As estirpes com um perfil isoenzimático idêntico constituem um zimodeme, ou seja, um conjunto de estirpes que possuem a mesma mobilidade electroforética para o número dos sistemas enzimáticos estudados. O estudo do perfil isoenzimático foi realizado através de electroforese a partir do extracto proteico da estirpe, segundo o método descrito por Maazoun *et al.* (1981) e Pasteur *et al.* (1987). Na análise foram utilizados 15 sistemas enzimáticos (malato-desidrogenase, EC 1.1.1.37; enzima málica, EC 1.1.1.40; isocitrato desidrogenase, EC 1.1.1.42; 6-fosfogluconato desidrogenase, EC 1.1.1.44; glucose-6-fosfato desidrogenase, EC 1.1.1.49; glutamato desidrogenase, EC 1.4.1.3; diaforase, EC 1.6.2.2; nucleosido-purina fosforilase 1, EC 2.4.2.1; nucleosido-purina fosforilase 2, EC 2.4.2; fosfoglucomutase, EC 5.4.2.2; aspartato aminotransferase 1 e 2, EC 2.6.1.1; fumarato hidratase, EC 4.2.1.2; manose fosfato isomerase, EC 5.3.1.8; glucose fosfato isomerase, EC 5.3.1.9). Em cada electroforese analisaram-se paralelamente estirpes de referência (Rioux *et al.*, 1990).

A identificação isoenzimática das estirpes isoladas neste inquérito, foi efectuada por F. Pratlong, no “Laboratoire d’Écologie Médicale et Pathologie Parasitaire”, Faculdade de Medicina, Universidade de Montpellier, França.

2.2.6 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o programa “Statistical Package for the Social Sciences 15.0” (SPSS). Aplicou-se o Teste de Chi-quadrado de forma a comparar a prevalência da leishmaniose nos cães com dono

(domésticos) e sem dono (vadios) e, de entre os animais infectados assintomáticos, a prevalência de animais domésticos e sem dono. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Este estudo foi realizado segundo as Boas Práticas de Bem-estar Animal aprovado pela Comissão de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, e seguiu as recomendações da Legislação Portuguesa de Protecção dos Animais (Lei nº 92/95, 12.9).

2.3 Resultados e Discussão

O inquérito epidemiológico abrangeu 374 cães, 277 com dono e 97 sem dono, provenientes de diferentes áreas da RML. As amostras biológicas foram analisadas serologicamente pelas técnicas de IFI e CIE e parasitologicamente através de pesquisa do parasita em cultura.

Na totalidade dos cães estudados, 72 cães estavam infectados (2 reacções serológicas positivas ou exame cultural positivo), correspondendo a uma prevalência total de Lcan de 19,2%. Verificou-se uma prevalência de 21,6% nos cães sem dono e 18,4 % nos cães com dono (Quadro 2.1). A diferença entre estas duas percentagens não foi estatisticamente significativa ($p = 0,48$).

Quadro 2.1. Distribuição da prevalência da infecção por grupo de animais.

Grupo de animais	Nº de cães	Nº de cães infectados	Nº de cães infectados sintomáticos	Nº de cães infectados aparentemente saudáveis
cães com dono	277	51 (18,4 %)	31	20 (39,2 %)
cães sem dono	97	21 (21,6 %)	15	6 (28,7 %)
TOTAL	374	72 (19,2 %)	46	26 (36,1 %)

No que respeita à percentagem de casos de Lcan encontrada nos diferentes concelhos, o concelho de Loures registou 28,8% (40/139) de cães infectados seguido do concelho de Cascais com 20,0 % (3/15), Seixal com 15,8 % (6/38), Lisboa com 15,3% (2/13) e Sintra com 12,4% (21/169).

A prevalência total de 19,2%, registada neste inquérito na área urbana e peri-urbana de Lisboa, mostrou ser muito diferente da observada anteriormente (3,8%) em 1987 por Abranches *et al.* (1987). O aumento da prevalência de Lcan nas zonas urbanas e peri-urbanas, pode dever-se a alguns factores, tal como a urbanização de focos zoonóticos naturais, ou seja, a construção maciça em áreas que há umas décadas atrás eram essencialmente rurais (Campino, 2002). Esta construção, muitas vezes desregulada, nas zonas peri-urbanas pode igualmente levar a um grande aumento de desperdícios sólidos com condições sanitárias deficientes, atraindo cães vadios potencialmente infectados ou disponíveis para a infecção. Por outro lado, também os bairros residenciais de vivendas com jardins, onde a presença dos cães é habitual, proporcionam um bom habitat para os flebótomos. Estudos de prevalência da Lcan noutras cidades, apontam igualmente para a “urbanização” desta parasitose, nomeadamente em Madrid, Atenas e Paulista (cidade localizada no estado de Pernambuco, Brasil) onde se encontraram seroprevalências respectivamente de 7,8%, 22,4% e 40,3%, (Miró *et al.*, 2007; Sideris *et al.*, 1999; Dantas-Torres *et al.*, 2006).

Apesar de considerarmos a prevalência encontrada neste estudo relativamente elevada, esta poderá, no entanto, estar a ser subestimada, uma vez que apenas se aplicaram técnicas convencionais (cultura, IFI e CIE). Se se tivessem utilizado técnicas mais sensíveis, como as técnicas moleculares, estes valores provavelmente seriam bastante superiores. Em diversos inquéritos epidemiológicos, as técnicas de ELISA e IFI para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, mostraram subestimar as prevalências (Asford *et al.*, 1995; Berrahal *et al.*, 1996). Num estudo efectuado na ilha de Maiorca, com a aplicação da IFI, foi observada uma seroprevalência de Lcan de 26,0%, enquanto que a prevalência da infecção quando calculada com base nos animais seropositivos e/ou positivos por PCR em qualquer dos tecidos analisados (pele, conjuntiva ou medula óssea) foi de 67,0%. (Solano-Gallego *et al.*, 2001).

No nosso estudo, apesar de a diferença de prevalência da Lcan nos cães com dono e nos cães vadios não ter sido estatisticamente significativa, seria de esperar uma

maior prevalência da infecção nos cães vadios, uma vez que estes animais não têm as mesmas condições físicas e sanitárias que os cães com dono. Por outro lado, estes resultados suportam a importância do papel desempenhado pelos cães vadios na transmissão do parasita, na região de Lisboa. Num estudo recente efectuado ao longo de um período de 10 anos, na cidade de Madrid, em 1803 cães vadios, os autores observaram uma seroprevalência média de 7,8% (Miró *et al.*, 2007), que apesar de ser bastante menor que a por nós encontrada, o número de cães estudados e o período de tempo é muito mais alargado, no entanto, por ano, os autores chegaram a encontrar 16,4% de prevalência.

Do total dos 374 cães, 307 não tinham quaisquer sinais de doença, tendo sido considerados assintomáticos e 67 apresentavam suspeita clínica de leishmaniose, sendo considerados sintomáticos. De entre o total de cães infectados (72) observaram-se 26 (36,1%) animais assintomáticos ou aparentemente saudáveis. A diferença entre o número de cães assintomáticos com dono (20 em 51) e sem dono (6 em 21) de entre os animais infectados (Quadro 2.1), não foi estatisticamente significativa ($p = 0,39$). O número de cães infectados mas aparentemente saudáveis foi inferior ao que seria de esperar, uma vez que diversos estudos mostraram que mais de metade dos animais seropositivos são assintomáticos (Campino *et al.*, 1995; Berrahal *et al.*, 1996; Cardoso *et al.*, 2004; Miró *et al.*, 2007). Apesar de alguns autores referirem que os cães assintomáticos são reservatórios menos eficientes do que os sintomáticos (Campino, 2002), é importante conhecer o papel dos cães assintomáticos na transmissão do parasita *Leishmania*. O número elevado de animais domésticos assintomáticos que não estão submetidos a qualquer medida de controlo por não evidenciarem sinais de doença, poderá estar a contribuir para a expansão da leishmaniose, uma vez que são uma fonte de infecção para o vector; também os cães vadios, com hábitos de vida ao ar livre, longe do controlo veterinário poderão contribuir ainda para um controlo muito mais dificultado e menos eficaz da Lcan.

Como forma de controlo da Lcan, existem posições contrárias quanto à eliminação de cães doentes ou seropositivos e, na maior parte dos países endémicos, esta não é uma medida aceitável por questões éticas e sociais. Para além disso, este tipo de medidas de controlo acabam por ser ineficazes devido à elevada proporção de cães assintomáticos, que poderão ser capazes de infectar os flebótomos (Moreno & Alvar,

2002), bem como ao elevado número de cães vadios (por exemplo, é estimado um milhão de cães errantes em Espanha). Na maior parte dos países, fazer um rastreio a todos os cães todos os anos, não é economicamente exequível quer a uma escala local, quer regional ou mesmo nacional, precisamente porque a incidência da leishmaniose humana é baixa (Moreno & Alvar, 2002).

Paralelamente a este estudo da Lcan na RML, e no âmbito do mesmo projecto (“Leishmania Genotyping”, QLK2-CT-2001-01810), foi elaborado um estudo na população vectorial na mesma região geográfica, efectuado por C. Alves-Pires e M.O. Afonso da Unidade de Entomologia Médica/UPMM do IHMT, revelando uma densidade vectorial que variou entre 0,1% e 7,7% (espécimen por armadilha do tipo CDC e por noite). Os vectores foram identificados de acordo com chaves entomológicas standardizadas (Alves-Pires, 2000), tendo sido identificados 80,3% de *Ph. perniciosus*, 19,1% de *Ph. ariasi* e 0,6% de *Ph. sergenti* (Cortes *et al.*, 2007), espécies estas preferencialmente zoofílicas. Observou-se uma taxa de infecção de 1,2%, que correspondeu a uma fêmea de *Ph. ariasi* infectada, capturada no concelho do Seixal. Contrariamente ao que seria de esperar, a abundância vectorial no concelho de Loures (que registou a maior percentagem de cães infectados) foi baixa nos biótopos estudados, reforçando a necessidade de estudos vectoriais mais extensos nas áreas afectadas pela leishmaniose. Estudos realizados no âmbito das alterações climáticas, através de modelos matemáticos apropriados, permitiram concluir que, a manter-se a tendência do aquecimento global, os períodos favoráveis à transmissão da leishmaniose terão tendência a aumentar, nomeadamente em Portugal, em algumas regiões dos distritos do Porto, Lisboa e Faro, quer devido ao aumento do número de meses de actividade flebotomínica, quer devido ao aumento do período favorável ao desenvolvimento dos parasitas de *Leishmania* nos flebótomos vectores (Calheiros & Casimiro, 2006).

Na Lcan, o facto de ainda não haver vacina eficaz e comercializada na Europa, faz com que actualmente a principal medida para prevenir a infecção nos cães domésticos seja a utilização de repelentes de insectos, entre os quais coleiras impregnadas com deltametrina, que têm apresentado bons resultados em diversos estudos (Maroli *et al.*, 2001; Reitinger *et al.*, 2004). Outra forma de prevenção passará por abrigar os cães dentro de casa, desde o entardecer até ao amanhecer, durante o período no qual os flebótomos demonstram maior actividade. Por outro lado, a

prevenção passará por desenvolvimento de acções de sensibilização dos proprietários dos cães, e mesmo da população em geral, para esta zoonose. Um estudo recente efectuado em Portugal, revelou que o conhecimento actual sobre a Lcan junto dos proprietários de cães em Portugal Continental, é reduzido, uma vez que quase 50,0% dos proprietários de cães desconheciam a existência desta parasitose (Neves *et al.*, 2007).

Apesar de alguns estudos terem mostrado uma relação directa entre a prevalência da Lcan e a leishmaniose humana, os nossos resultados mostram que a Lcan é muito mais prevalente e mais amplamente distribuída do que a leishmaniose humana e não se correlaciona com a incidência dos casos humanos como já anteriormente referido por Campino (2002). Entre 2002 e 2006, a UEI de Leishmanioses do IHMT registou 20 novos casos de LV em imunocompetentes, crianças (16) e adultos (4), e 75 casos em imunocomprometidos. Apesar do número de novos casos ser muito mais elevado em indivíduos imunocomprometidos, nomeadamente doentes co-infectados com o HIV, de um modo geral, só os indivíduos imunocompetentes reflectem a transmissão zoonótica natural, uma vez que os indivíduos imunocomprometidos são, na sua maioria, dependentes de drogas endovenosas e utilizam as seringas contaminadas como meio artificial de transmissão de *Leishmania* (Alvar *et al.*, 1994; Campino *et al.*, 1994).

Dos 72 cães infectados, o diagnóstico parasitológico permitiu o isolamento de 49 estirpes de *Leishmania*, que foram identificadas por tipagem isoenzimática como *L. infantum* MON-1. *L. infantum* MON-1 foi, à excepção de um caso de um cão infectado com *L. infantum* MON-98 na região do Alto Douro (Cardoso *et al.*, 2002), o único zimodeme até agora identificado em Portugal (Campino *et al.*, 2006). Noutros países da bacia mediterrânica, o zimodeme MON-1 é também o mais frequentemente encontrado no hospedeiro canino. No entanto, outros zimodemes têm sido identificados em cães com leishmaniose, nomeadamente em Espanha, França, Itália, Grécia, Marrocos e Argélia: MON-11, MON-24, MON-27, MON-34, MON-37, MON-72, MON-77, MON-98, MON-105, MON-108 e MON-199 (Gramiccia *et al.*, 1992; Dereure *et al.*, 1999; Martin-Sanchez *et al.*, 2004; Pratlong *et al.*, 2004; Haralambous *et al.*, 2007). Em Portugal, apesar de 94,6% dos isolados (87 em 92) em casos humanos terem sido identificados como *L. infantum* MON-1, outros zimodemes foram identificados, tais como MON-24, MON-29 e MON-80 em doentes imunocomprometidos com LV e num

caso de leishmaniose cutânea (MON-24) num doente imunocompetente (Campino *et al.*, 2006). O facto de, em Portugal, o zimodeme MON-1, com uma excepção, ser o zimodeme isolado no hospedeiro canino, tendo contudo outros zimodemes sido encontrados no hospedeiro humano e vector (Pires *et al.*, 1991), sugere a possível existência de outros reservatórios para além do cão. Igualmente na maioria dos países do Sul da Europa e Norte de África, apesar de MON-1 ser dominante no hospedeiro humano, têm sido identificados casos esporádicos de outros zimodemes corroborando a sugestão anterior. Um rastreio recente de leishmaniose felina efectuado na região de Lisboa, revelou 30,4% de gatos infectados (Maia *et al.*, *em publicação*). A elevada prevalência da infecção por *Leishmania* encontrada na população felina naquele trabalho e em outros estudos (Gramiccia *et al.*, 2005; Martin-Sanchez *et al.*, 2007), indicia o papel do gato como reservatório habitual e não apenas hospedeiro accidental.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LEISHMANIA POR KDNA- PCR E HIDRÓLISE DO DNA AMPLIFICADO

3. Caracterização molecular de *Leishmania* por kDNA- PCR e hidrólise do DNA amplificado

3.1 Introdução

As técnicas baseadas na reacção em cadeia da polimerase (PCR) são as que, de entre as diferentes metodologias moleculares, permitem a aplicação de abordagens mais sensíveis e portanto uma melhor avaliação da diversidade genética de *Leishmania*.

O DNA cinetoplastideal (kDNA), já abordado no Capítulo I, tem sido amplamente utilizado como alvo molecular para a caracterização genética de *Leishmania* e de outros cinetoplastídeos. Estudos anteriormente efectuados apontam para uma rápida evolução das sequências do kDNA, permitindo a diferenciação de estirpes próximas. Por outro lado, a presença de sequências conservadas e de multiplas cópias têm sido úteis na detecção dos tripanossomatídeos (Barker, 1987; Lambson & Barker, 2002).

O método de PCR - polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição de DNA (do inglês “restriction fragment length polymorphism”) (PCR-RFLP), baseia-se na hidrólise do produto amplificado por PCR, com enzimas de restrição (endonucleases) que fragmentam a sequência nucleotídica em locais específicos. Os diferentes padrões de restrição ou esquizodemos são originados por mutações pontuais no local de restrição ou devido a inserções ou deleções. Esta técnica tem sido aplicada nos parasitas do género *Leishmania* para diferenciação entre espécies, utilizando como alvo molecular uma sequência da pequena sub-unidade do RNA ribossomal (Van Eys *et al.*, 1992), para distinção entre isolados de *L. tropica*, tendo como alvo a sequência da região ITS1 (Schönian *et al.*, 2001), e como diferenciação entre recaídas e re-infecções em doentes co-infectados com o VIH, utilizando o kDNA como alvo molecular (Morales *et al.*, 2002; Chicharro *et al.*, 2002). Com a utilização de PCR-RFLP, Noyes *et al.* (1998) demonstraram que os zimodemes de *L. infantum*, presentes na bacia do Mediterrâneo, podem ser

classificados em subgrupos. No Novo Mundo outros autores verificaram a existência de variação intra e inter-específica em isolados de *L. braziliensis* por análise de esquizodemos. (Cupolillo *et al.*, 1995)

O objectivo deste estudo foi o de analisar a diversidade genética de *L. infantum* a partir de isolados do hospedeiro humano, reservatório e vector, obtidos em diferentes regiões geográficas de Portugal, utilizando o método de PCR-RFLP aplicado ao kDNA. As amostras portuguesas foram comparadas com isolados de *L. infantum* provenientes de outros países e continentes.

3.2 Material e métodos

3.2.1 População estudada

Neste estudo analisou-se um total de 161 amostras de DNA de *Leishmania*, sendo 134 provenientes de diferentes regiões geográficas de Portugal nomeadamente região do Alto Douro, região Centro, região Metropolitana de Lisboa (RML), Alentejo e Algarve, e 27 amostras de outros países da Bacia mediterrânica, de África e do Brasil.

3.2.1.1 Casos portugueses de leishmaniose humana

Para a caracterização molecular dos isolados em casos autóctones de leishmaniose humana, foram analisadas 64 amostras (medula óssea no caso de leishmaniose visceral, e pele no caso de leishmaniose cutânea e viscero-cutânea) (Apêndice 1). As diferentes amostras foram provenientes de doentes imunocompetentes e imunodeprimidos de diferentes regiões geográficas do país. Neste grupo de amostras estão incluídos recidivas em 12 indivíduos imunocomprometidos, tendo dois desenvolvido leishmaniose viscero-cutânea (LVC) após tratamento (Quadro 3.1). Consideraram-se recidivas os episódios que se sucederam após tratamento do primeiro episódio e com análise parasitológica negativa anterior a estes casos. Definiu-se LVC ao quadro clínico de LV com concomitantes lesões cutâneas. Um dos casos de LVC diagnosticados na RML, é referente a um doente que apresentava uma patologia de leishmaniose semelhante a leishmaniose dérmica pós-Kala-

azar (PKDL) (Catorze *et al.*, 2006). Todas as amostras em estudo foram recebidas pela Unidade de Leishmanioses para diagnóstico, provenientes de diversos hospitais do país.

Quadro 3.1. Número, forma clínica, situação imunitária e distribuição geográfica das amostras humanas portuguesas.

Região	Hospitais	Imunocompetentes		Imunodeprimidos			Total
		LV	LC	LV	LC	LVC	
Alto Douro	Distrital de Vila Real	9	4				13
	Tomar			1			1
Centro	Distrital de Caldas da Rainha			1			1
	Distrital de Santarém					1	1
RML	Lisboa ¹	1	1	34	1	4	41
	Distrital de Setúbal			1			1
Alentejo	Distrital de Beja	2					2
Algarve	Distrital de Faro		1	3			4
Total		12	6	40	1	5	64

RML, Região Metropolitana de Lisboa; LV, leishmaniose visceral; LC, leishmaniose cutânea; LVC, leishmanioses viscero-cutânea.

¹ Amostras provenientes dos Hospitais: Santa Maria, Egas Moniz, Garcia de Orta, Estefânea e Prisional S. João de Deus.

Das amostras estudadas, 58 foram identificadas por análise electroforética de enzimas (*multilocus enzyme electrophoresis*, MLEE) no *Centre National de Référence des Leishmanioses*, Montpellier, França, 51 como *L. infantum* zimodeme MON-1, três como MON-29, uma como MON-24, duas estirpes identificadas como novas variantes de *L. infantum* e uma como híbrido de *L. infantum*/*L. major*. Seis amostras não foram identificadas por análise isoenzimática.

3.2.1.2 Casos portugueses de leishmaniose animal

A análise molecular da leishmaniose animal foi realizada num total de 63 amostras de DNA (Apêndice 2), provenientes de diversas regiões do país, obtidas a partir de aspirado de medula óssea ou de gânglio poplíteo; 50 amostras foram recolhidas no estudo epidemiológico canino, realizado entre 2002 e 2003, descrito no Capítulo 2 (Quadro 3.2).

Todos os isolados caninos foram identificados por tipagem isoenzimática como *L. infantum* MON-1.

Foram, ainda, analisados quatro isolados de raposas da RML, provenientes do Parque Natural da Arrábida, tipados isoenzimaticamente como *L. infantum* MON-1.

Quadro 3.2. Número e distribuição geográfica das amostras caninas portuguesas.

Região	Concelho	Total
Alto Douro	Vila Real	3
	Lisboa	1
RML	Loures	40
	Oeiras	1
	Queluz	3
	Seixal	4
	Setúbal	2
Alentejo	Évora	8
Algarve	Olhão	1
Total		63

RML, Região Metropolitana de Lisboa.

3.2.1.3 Vector

Foram igualmente estudados três isolados de flebótomos, dois de *Phebotomus ariasi*, capturados nos concelhos de Alijó e Santa Marta de Penaguião, região do Alto Douro, e um de *Ph. perniciosus*, proveniente do concelho de Loulé, região do Algarve. Todos foram tipados com *L. infantum* MON-1.

3.2.1.4 Amostras de outros países

Neste estudo foram igualmente incluídas 27 amostras de DNA de *Leishmania* de alguns países da bacia mediterrânica (Espanha, França, Grécia e Malta), cinco de África (Etiópia e Sudão) e oito do Brasil, identificadas por tipagem isoenzimática como *L. infantum* e *L. donovani* (Quadro 3.3). Estas amostras foram gentilmente cedidas por investigadores de laboratórios estrangeiros com quem colaboramos (C. Canãvate, Instituto Carlos III, Madrid, Espanha; I. Maurício, *London School of Hygiene and Tropical Medicine*, Londres, Reino Unido; K. Soteriadou, Instituto Pasteur, Atenas, Grécia; J. P. Dedet, *Centre National de Reference des Leishmanioses* de Montpellier, França; R. Brazil, Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCrux), Rio de Janeiro e N. Mello, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil).

Quadro 3.3. Origem geográfica, forma clínica e espécie de *Leishmania* das amostras provenientes de outros países.

Amostras	Origem geográfica	Forma clínica	Espécie	Zimodeme	Código internacional
ESP1	Espanha	LV	<i>L. infantum</i>	1	MHOM/ES/93/PM1
ESP2		LC	<i>L. infantum</i>	1	MHOM/ES/86/BCN16
ESP3		Lcan	<i>L. infantum</i>	1	MCAN/ES/2001/LLM-1007
ESP4		Lcan	<i>L. infantum</i>	1	MCAN/ES/2002/LLM-1139
ESP5		LV	<i>L. infantum</i>	1	MHOM/ES/2001/LLM-981
FR1	França	LV	<i>L. infantum</i>	1	MHOM/FR/78/LEM75
FR2		LC	<i>L. infantum</i>	1	MHOM/FR/97/LSL29
FR3		LC	<i>L. infantum</i>	11	MHOM/FR/80/LEM189
MLT1	Malta	LC	<i>L. infantum</i>	78	MHOM/MT/85/BUCK
GR1	Grécia	LV	<i>L. infantum</i>	1	MHOM/GR/2002/GR26
GR2		Lcan	<i>L. infantum</i>	1	MCAN/GR/2002/GR9
GR3		Lcan	<i>L. infantum</i>	1	MCAN/GR/2003/GR12
GR4		Lcan	<i>L. infantum</i>	98	MHOM/GR/2003/GR19
GR5		LV	<i>L. infantum</i>	98	MHOM/GR/2004/GR17
SD1	Sudão	LV	<i>L. infantum</i>	81	MHOM/SD/62/3S
SD2		LV	<i>L. donovani</i> ¹	30	MHOM/SD/82/GILANI1
ET1	Etiópia	LV	<i>L. donovani</i>	31	MHOM/ET/00/HUSSEN
ET2		LC	<i>L. donovani</i>	18	MHOM/ET/67/HU3 (LV9)
ET3		LV	<i>L. donovani</i> ²	82	MHOM/ET/72/GEBRE 12
BR1	Brasil	LV	<i>L. infantum</i>	1	MHOM/BR/74/PP75
BR2		LV	<i>L. infantum</i>	1	MHOM/BR/72/46
BR3		LV	<i>L. infantum</i>	1	MHOM/BR/2001/RR071
BR4		LV	<i>L. infantum</i>	1	MHOM/BR/2001/RR072
BR5		LV	<i>L. infantum</i>	1	MHOM/BR/1998/RR055
BR6		Lcan	<i>L. infantum</i>	1	MCAN/BR/2002/BH400
BR7		Lcan	<i>L. infantum</i>	1	MCAN/BR/2001/BH401
BR8		Lcan	<i>L. infantum</i>	1	MCAN/BR/2002/BH402

LV, leishmanose visceral; LC, leishmaniose cutânea; Lcan, leishmaniose canina.

Estirpes previamente classificadas como ¹*L. infantum* e ²*L. archibaldi* (Maurício *et al.*, 2007)

3.2.1.5 Amostras aplicadas ao estudo da estabilidade do kDNA e especificidade das sequências iniciadoras MC1 e MC2

Para testar a estabilidade do kDNA como marcador molecular utilizaram-se quatro pares de estirpes de *L. infantum* MON-1, duas humanas e duas caninas, contendo cada par DNA extraído do isolado original e após longos períodos de cultura *in vitro* (três a cinco anos).

Para o estudo da especificidade das sequências iniciadoras MC1 e MC2 (descritas em 3.2.3) desenhadas no âmbito deste estudo, foi analisado DNA de diversas espécies de *Leishmania* e de outros microorganismos (Quadro 3.4). Foi também incluído um grupo de amostras de DNA de mamíferos não infectados, consideradas como controlos negativos que incluem: medula óssea de cão, baço de raposa, baço de murganho assim como sangue de um doente infectado com o VIH e sangue de um dador voluntário.

Quadro 3.4. Espécies de *Leishmania* e outros microorganismos utilizados para o estudo da especificidade das sequências iniciadoras MC1/ MC2.

Espécie	Origem geográfica	Código internacional
<i>L. major</i>	ex-União Soviética	MHOM/SU/1973/5-ASKH
<i>L. major</i>	Israel	MHOM/IL/67/Jericho II:LV561
<i>L. tropica</i>	ex-União Soviética	MHOM/SU/1974/K27
<i>L. braziliensis</i> ¹	Portugal	MHOM/PT/99/IMT252
<i>L. guyanensis</i> ¹	Portugal	MHOM/PT/96/IMT217
<i>L. peruviana</i>	Perú	—
<i>L. infantum</i>	Brasil	MHOM/BR/72/46VL
<i>L. infantum</i>	Brasil	MHOM/BR/058
<i>L. infantum</i>	Brasil	MHOM/BR/74/0PP75
<i>L. donovani</i> MON-18	Portugal	MHOM/PT/92/IMT 180
<i>L. donovani</i> MON-18	Etiópia	MHOM/ET/67/HU3 (LV9)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Brasil	—
<i>Trypanosoma b. brucei</i>	?	—
<i>Plasmodium falciparum</i>	São Tomé e Príncipe	—
<i>Pneumocystis carinii</i>	Portugal	—
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Portugal	—
<i>Mycobacterium avium</i>	Portugal	—

¹, casos importados da América Central e do Sul.

3.2.2 Extracção de DNA

DNA extraído a partir de amostras clínicas

A extracção de DNA a partir de amostras clínicas, medula óssea, aspirado de gânglio linfático e biópsia de pele, foi realizada com um “kit” comercial “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Esta técnica tem por base a ligação dos ácidos nucleicos às fibras de vidro existentes na coluna de extracção na presença de um sal. Resumidamente, depois de homogeneizado 25-50 mg do tecido num tubo de 1,5 ml, efectuou-se uma incubação de uma hora a +56°C com 40 µl de proteinase K e 200 µl de tampão de lise (4 M ureia, 200 mM NaCl, 200 mM EDTA, pH 7.4). Seguidamente adicionou-se 200 µl de tampão de ligação [6 M guanidina-HCl, 20% Triton X-100 (v/v), pH 4.4], por forma a inactivar as nucleases e efectuou-se uma outra incubação a +72°C, 10 minutos.

Após incubação adicionou-se 100 µl de isopropanol, homogeneizou-se bem. De seguida fez-se passar o produto na coluna de extracção e centrifugou-se a 4500 g, durante um minuto. Após a centrifugação descartou-se o tubo com o produto recolhido e combinou-se a coluna com um novo tubo. Adicionou-se 500 µl de tampão de remoção (5M guanidina-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6.6) Para a remoção de possíveis inibidores e centrifugou-se a 4500 g, durante um minuto. Ao passar na coluna, os ácidos nucleicos ligam-se selectivamente às fibras de vidro. Em seguida, o DNA ligado foi purificado com tampão de lavagem (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5) centrifugando-se duas vezes a 4500 g durante um minuto por forma a removerem-se os componentes celulares contaminantes. Após a lavagem, fez-se uma centrifugação a 13000 g durante um minuto, para a remoção de possíveis vestígios de tampão de lavagem.

Por fim, para a eluição do DNA, descartou-se o líquido recolhido e combinou-se a coluna com um novo tubo colector de 1,5 ml. De seguida, adicionou-se à coluna 200 µl de tampão de eluição (10 mM Tris, pH 8.5) (previamente aquecido a +70°C, no banho-Maria) e centrifugou-se a 4500 g durante um minuto. A utilização de uma solução de baixa concentração salina (Tris-HCl) permite a libertação dos ácidos nucleicos da coluna de

extracção. O tubo colector final contém o DNA eluído. Depois de extraído o DNA foi conservado a -20°C até posterior utilização.

DNA extraído a partir de cultura de *Leishmania*

Antes de se proceder à extracção do DNA dos parasitas em cultura, foi optimizada a concentração das formas promastigotas, em cultura em meio de Schneider (Sigma). Foi utilizada uma concentração de 10^7 promastigotas por ml, por contagem em câmara de Neubauer. Após o crescimento dos promastigotas em cultura, estes foram sub-cultivados em meio Schneider (Sigma) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Cambrex, Rockland, USA) para posterior extracção de DNA.

Os parasitas foram sedimentados por centrifugação a 956 g, durante 10 minutos à temperatura ambiente e depois lavados por dupla centrifugação e ressuspensão em tampão fosfato salino (“phosphate-buffered saline”- PBS, pH 7.2), sendo por fim ressuspensos em 200 µl de PBS. A extracção de DNA dos parasitas em cultura efectuou-se seguidamente com o “kit” “High Pure PCR Template Preparation Kit” comercial, mas omitindo a primeira incubação com o tampão de lise. Depois de extraído, o DNA foi conservado a -20°C até posterior utilização.

3.2.3 Amplificação do DNA

3.2.3.1 Escolha das sequências iniciadoras

O desenho das sequências iniciadoras (ou “primers”), bem como a sua análise para detectar a potencial existência de dímeros, efectuou-se com o programa “Primer 3 Program” (Whitehead Institute, Massachusetts Institute of Technology, USA). Para a amplificação do kDNA foi então seleccionado um par de sequências iniciadoras, MC1 e MC2, a partir de uma sequência completa do minicírculo de *L. infantum* (Apêndice 3). No Quadro 3.5 encontram-se descritas as sequências iniciadoras utilizadas na amplificação do kDNA. Estes “primers” amplificam uma sequência com 447 pares de bases, dos quais 42 pb fazem parte da região conservada do minicírculo e os restantes 405 pb pertencem à

região variável. O “primer” MC1 encontra-se na região variável o “primer” MC2 encontra-se na região conservada.

Quadro 3.5. Sequências iniciadoras desenhadas para a amplificação de DNA cinetoplastideal.

Alvo molecular	Sequências iniciadoras	Sequência
kDNA	MC1	5' GTTAGCCGATGGTGGTCTTG 3'
	MC2	5' CACCCATTTTTCGATTTTG 3'

3.2.3.2 Reacção de PCR

Efectuou-se uma optimização das condições de PCR para os “primers” MC1 e MC2: concentração de cloreto de magnésio (MgCl_2), concentração das sequências iniciadoras e ao nível da temperatura de ligação, tempos de ligação e de extensão. A reacção de amplificação do kDNA foi efectuada num volume de 50 μl contendo 1X tampão de reacção (160 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 670 mM Tris-HCl [pH 8,8], 0,1% Tween-20) (Bioline, Londres, UK), 1,5 mM de MgCl_2 (Bioline), 0,2 mM de uma mistura dos desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Bioline), 5 pmol de cada um dos “primers” (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 2 U de *Taq* DNA Polymerase (Bioline), entre 2,5 a 5 μl (aproximadamente 100 ng) de DNA genómico e água ultra-pura estéril, para completar o volume final. As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador “Px2 Thermal Cycler” (Thermo Fisher Scientific), segundo as condições descritas no Quadro 3.6.

Em todas as amplificações foi utilizado um controlo positivo contendo DNA genómico de *L. infantum* e um controlo negativo sem DNA, contendo água.

Quadro 3.6. Condições de amplificação do kDNA com as seqüências iniciadoras MC1 e MC2.

PCR	Condições de amplificação			
	Fases	Temperatura	Duração	Nº de ciclos
kDNA (MC1/ MC2)	Desnaturação inicial	94°C	2 min	1
	Desnaturação	94°C	20 seg	30
	Ligação	60°C	20 seg	
	Extensão	72°C	30 seg	
	Extensão final	72°C	5 min	1

Avaliou-se igualmente o limite de detecção das seqüências iniciadoras MC1 e MC2 comparativamente com outras, AJS1(5' GGGGTTGGTGTAATAAGGGCCGG 3') E DBY (5'CCAGGTTCCCGCCCCGGAG 3'), que amplificam o minicírculo completo e se situam na região conservada do minicírculo (Smyth *et al.*, 1992). Para isso efectuaram-se diluições seriadas de uma cultura de uma estirpe de *L. infantum* (MCAN/PT/94/IMT205), variando de 10^4 a um parasita, e em seguida efectuou-se extracção de DNA como anteriormente referido (sub-capítulo 3.2.2). As condições de PCR para o par de seqüências AJS1/DB8 foram as mesmas que para as seqüências iniciadoras MC1/MC2, mas com 38 ciclos de amplificação e uma temperatura de ligação de 61°C durante 30 segundos, uma vez que se efectuou uma adaptação ao termociclador em uso.

3.2.3.3 Visualização dos produtos de PCR

Os fragmentos de DNA amplificado foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) em tampão TAE 1X (0,04M tris-HCL a pH 8,0; 0,002M EDTA; 0,02 M acetato de sódio) ao qual se adicionou brometo de etídio (concentração final 0,5µg/ml). O gel polimerizado foi colocado numa tina de electroforese horizontal com tampão TAE 1X. Colocou-se 10µl de produto de PCR de cada amostra, com a adição de solução corante de laranja G [40% (p/v) de sacarose (BDH, Darmstadt, Germany) e 0,25% de laranja G (Merck, Darmstadt, Alemanha)] (5:1).

Simultaneamente com as amostras colocou-se um marcador de massa molecular de 100 pares de base (pb) (Bio-Rad, Hercules, USA). Aplicou-se uma corrente eléctrica de 110V durante 60 minutos. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados e fotografados no sistema UVIDOC (Alfagene, Fords, USA), sob luz ultravioleta (UV), por emissão de fluorescência do brometo de etídio intercalado no DNA.

3.2.4 Purificação dos produtos amplificados por PCR

Num primeiro grupo de amostras os produtos amplificados foram purificados com o “kit” comercial “High Pure PCR Product Purification Kit” (Roche) de acordo com as instruções do fabricante, para remover sais, restos de oligonucleótidos iniciadores e nucleótidos não incorporados, que interferem com a reacção de sequenciação. Resumidamente, adicionou-se 500 µl de tampão de ligação [(3 M guanidina-tiocianato, 10 mM Tris-HCl, 5 % etanol (v/v), pH 5.5] ao produto de PCR de cada amostra, homogeneizou-se, transferiu-se a mistura para as coluna de purificação e centrifugou-se durante um minuto a 13000 g. As colunas são constituídas por um disco de fibra de vidro, onde fica selectivamente retido o DNA. De seguida realizou-se uma dupla lavagem, durante um minuto a 13000 g, com 500 µl e 200 µl de tampão de lavagem (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5), respectivamente. Por fim, eluiu-se o produto de PCR já purificado, com 80 µl de tampão de eluição (10 mM Tris-HCl, pH 8.5), centrifugando-se a 13000 g durante um minuto. Os produtos de PCR purificados foram conservados a -20°C até posterior utilização.

Verificou-se que, em alguns casos, após a realização da purificação os produtos de PCR se perdiam a ponto de ser impossível a realização de RFLP, tendo sido abandonada a fase de purificação sem que os resultados da restrição enzimática fossem alterados. Deste modo, passou-se apenas a purificar os produtos de PCR que foram sequenciados.

3.2.5 Selecção das endonucleases

Procedeu-se à selecção das endonucleases de restrição que hidrolisassem a sequência alvo do kDNA amplificada pelas sequências iniciadoras MC1/MC2, de forma a analisar a ocorrência de potenciais polimorfismos aleatórios, nas amostras estudadas. Para isso, construiu-se o mapa de restrição do produto de PCR através do programa Webcutter 2.0 (www.firstmarket.com/cutter/cut2.html), no qual se introduziu uma sequência alvo do DNA do minicírculo de *L. infantum* (número de acesso do Genbank: AF169140). Do conjunto de endonucleases de restrição que hidrolisavam a sequência em estudo, seleccionaram-se sete, que se previa originarem fragmentos de dimensões variadas e com sequências de reconhecimento de 6 a 4 pares de bases. Posteriormente à análise de algumas sequências de amostras amplificadas e sequenciadas, seleccionaram-se outras duas endonucleases de restrição, *Dde*I e *Bgl*III, que fragmentavam em dois locais onde pareciam ocorrer mutações comuns a diferentes amostras (Quadro 3.7).

Quadro 3.7. Endonucleases de restrição utilizadas, sequência reconhecida e n.º de fragmentos de hidrólise previstos na sequência de *L. infantum* (Genbank nº AF169140).

Endonuclease	Sequência reconhecida	Fragmentos
<i>Bgl</i> II	5'-A▼GATCT-3'	3
<i>Bme</i> 1309I	5'-CC▼NGG-3'	3
<i>Dde</i> I	5'-C▼NGATG-3'	3
<i>Hpa</i> II	5'-C▼CGG-3'	3
<i>Pst</i> I	5'-CTGCA▼G-3'	2
<i>Rsa</i> I	5'-GT▼AC-3'	3
<i>Sfc</i> I	5'-C▼TRYAG3'	3
<i>Vsp</i> I	5'-AT▼TAAT-3'	3
<i>Xap</i> I	5'-R▼AATTY-3'	3

R = G ou A; Y = C ou T; N = G, A, C ou T.

3.2.6 Polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição de DNA-RFLP

Numa primeira fase, a caracterização molecular dos isolados de *Leishmania* foi realizada por análise dos perfis de restrição do DNA amplificado, após a sua hidrólise com as endonucleases de restrição seleccionadas. De forma a optimizar a restrição enzimática, foi determinado o número de unidades de enzima necessárias para digerir os produtos de PCR a analisar. Cada reacção de hidrólise foi feita num volume de 20 µl, contendo 10 U da endonuclease, 1X tampão de hidrólise específico para cada endonuclease (concentrado 10X), 6-10 µl do DNA amplificado por PCR e água ultra-pura estéril, até completar o volume final. A incubação foi realizada a +37°C, por três a quatro horas. O tempo de incubação foi anteriormente optimizado.

Os produtos de hidrólise foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 3% conforme descrito em 3.2.3.3, tendo-se aplicado 10 µl do produto de restrição previamente diluído em solução corante Laranja G. No mesmo gel aplicou-se um marcador molecular de 50 pb (GEHealthcare, Buckinghamshire, UK), e um controlo negativo (água ultra-pura estéril em substituição do DNA amplificado) e uma amostra de produto amplificado não hidrolisado, para confirmação de digestão.

3.2.7 Análise da diversidade genética

Cada padrão de restrição resultante da hidrólise dos produtos do kDNA-PCR pelas endonucleases, contribuiu para a determinação de um perfil ou genótipo que foi interpretado através de uma análise qualitativa.

As bandas no gel foram codificadas como presentes (1) ou ausentes (0). Foi construída uma matriz de distância usando o programa RESTDIST, a partir da qual foi construído um dendrograma com base no algoritmo de distância genética de Nei e Li (Nei & Li, 1979), utilizando o método de agrupamento “Neighbor-Joining” do programa NEIGHBOR, ambos pertencentes ao pacote PHYLIP (*Phylogeny Inference Package*) (Felsenstein, 2004). O dendrograma produzido foi efectuado com o programa MEGA

versão 4 (Tamura *et al.*, 2007). Os valores de confiança, para os ramos individuais da árvore, foram determinados, por análise de “bootstrap” com 100 réplicas.

Dois produtos de PCR, representativos de cada genótipo encontrado, foram aleatoriamente seleccionados para sequenciação de modo a confirmar os locais de hidrólise das endonucleases utilizadas. Depois de purificados, os produtos de PCR foram enviados para um laboratório comercial (StabVida) onde foram submetidos à reacção de sequenciação directa utilizando o “kit” comercial “BigDye v1.1” (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Werrington, UK), e analisados num sequenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Perkin-Elmer, Applied Biosystems). As sequências de DNA foram determinadas em ambos os sentidos com as sequencias iniciadoras MC1 e MC2, e produzindo-se uma sequência consenso. As sequências consenso obtidas a partir das diferentes amostras, foram alinhadas com o programa Clustal W.

3.2.8 Análise estatística

A correlação entre os perfis encontrados nas amostras de DNA estudadas, com as formas clínicas da doença e o estado imunológico do hospedeiro foi analisada. Os resultados foram agrupados e a análise foi efectuada utilizando o teste de Chi-Quadrado (χ^2) com um intervalo de confiança de 95%, com recurso ao programa “Statistical Package for the Social Sciences 13.0” (SPSS[®]).

3.3 Resultados

3.3.1 Produtos de PCR

Na amplificação do DNA de *Leishmania* por PCR, utilizando o DNA obtido a partir das culturas ou a partir de amostras clínicas do hospedeiro, obtiveram-se produtos de 447 pb, não se tendo observado bandas inespecíficas (Figura 3.1).

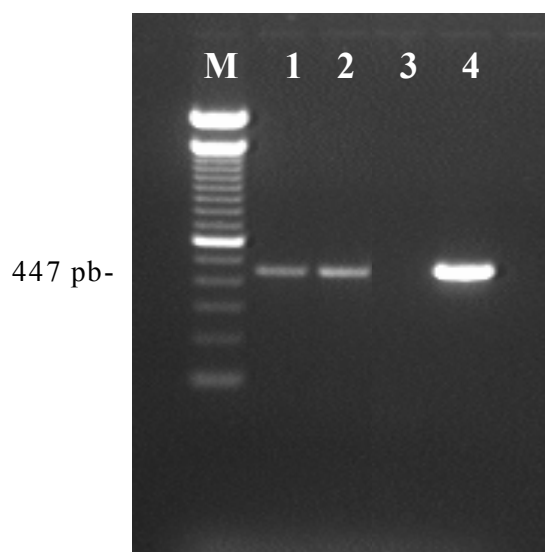


Figura 3.1. Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR com as sequências iniciadoras MC1/ MC2.

Sequência amplificada a partir de: Linha 1, amostra humana; Linha 2, amostra canina, Linha 3, controlo negativo (sem DNA); Linha 4, controlo positivo (amostra de cultura de uma estirpe de *L. infantum*). M, marcador de massa molecular de 100 pb.

3.3.2 Especificidade das sequências iniciadoras

A reacção de PCR com a utilização das sequências iniciadoras MC1/MC2, na análise de sete estirpes portuguesas de *L. infantum* (MON-1, MON-24 e MON-29), bem como estirpes de *L. infantum* (*L. chagasi*) do Brasil e *L. donovani*, originaram o produto de amplificação esperado (447 pb), não se tendo observado bandas inespecíficas, à excepção de uma amostra de *L. donovani* MON-18, isolada num doente português, que apresentou adicionalmente duas bandas ténues acima do produto esperado (Figura 3.2). Não se observou amplificação nas amostras consideradas como controlos negativos.



Figura 3.2. Electroforese em gel de agarose dos produtos do PCR com aplicação das sequências iniciadoras MC1/MC2 em amostras de DNA de diferentes espécies de *Leishmania* em cultura, outros microrganismos e diferentes amostras clínicas não infectadas.

Linhas 1-5, *L. infantum* MON-1; Linha 6, *L. infantum* MON-24; Linha 7, *L. infantum* MON-29; Linha 8, *L. donovani* MON-18 (Portugal); Linha 9, *L. donovani* MON-18 (Etiópia); Linhas 10-12, *L. infantum* (Brasil); Linhas 13-14, *L. major*; Linha 15, *L. tropica*; Linha 16, *L. braziliensis*; Linha 17, *L. guyanensis*; Linha 18, *Trypanosoma cruzi*; Linha 19, *T. brucei brucei*; Linha 20, *Plasmodium falciparum*; Linha 21, *Pneumocystis carinii*; Linha 22, *Mycobacterium tuberculosis*; Linha 23, *M. avium*; Linha 24, sangue de um dador humano saudável; Linha 25, sangue de um doente VIH positivo; Linha 26, medula óssea de um cão saudável; Linha 27, baço de uma raposa não infectada; Linha 28, baço de um murgancho não infectado; (-), sem DNA. M, marcador de massa molecular de 100 pb.

3.3.3 Sensibilidade (Limiar de detecção) das sequências iniciadoras

De forma a determinar o limite de detecção do PCR com as sequências iniciadoras MC1/MC2, e para comparar com outras sequências cinetoplastideais (AJS1/DBY), efectuaram-se diluições seriadas de expoente 10, de uma amostra de cultura de *L. infantum* (MCAN/PT/94/IMT205), variando de 10^4 a um parasita. Detectou-se produto de amplificação com os “primers” MC1/ MC2 para todas as diluições, até um parasita (Figura 3.3.A), mas apenas até 10^2 parasitas (Figura 3.3.B) com os “primers” AJS1/DBY (produto de 805 pb). Os resultados sugerem que os “primers” MC têm uma maior sensibilidade nas estirpes *L. infantum* portuguesas.

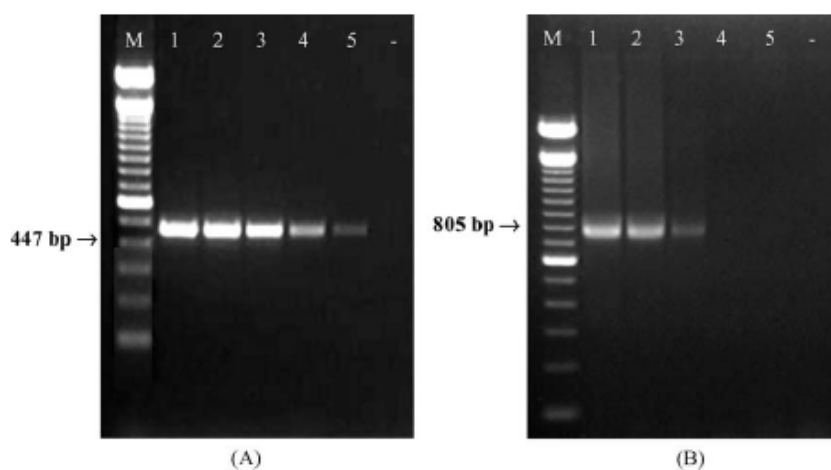


Figura 3.3. Limiar de detecção do DNA cinetoplastideal aplicando as sequências iniciadoras MC1/MC2 (A) e AJS1/DB8 (B).

DNA de: Linha 1, 10^4 parasitas; Linha 2, 10^3 parasitas; Linha 3, 10^2 parasitas; Linha 4, 10 parasitas; Linha 5, 1 parasita; (-), controlo negativo (sem DNA). M, marcador de massa molecular de 100 pb.

3.3.4 Diversidade genética dos isolados estudados

Para avaliação da variabilidade genética de *L. infantum* procedeu-se à amplificação do DNA por PCR e posterior restrição enzimática de 161 amostras, 134 portuguesas e 27 de outros países. A restrição dos produtos de PCR originou diversos padrões, tendo originado de 1 até 4 fragmentos de restrição com cada endonuclease (Quadro 3.8). Nestes padrões estão incluídos os fragmentos previstos menores que 40 pb, e que foram confirmados por sequenciação.

Os padrões de restrição obtidos com *Pst*I, *Sfc*I e *Xap*I revelaram-se monomórficos, enquanto que os padrões de restrição obtidos com *Bgl*II, *Bme*1390I, *Dde*I, *Hpa*II, *Rsa*I e *Vsp*I foram polimórficos (Figura 3.4). Estas últimas seis endonucleases foram as utilizadas para posterior análise. Alguns padrões obtidos diferem pelo número de locais de hidrólise, tal como se verifica nos padrões I/II/III de *Hpa*II, enquanto que outros com o mesmo número de bandas têm diferentes tamanhos, como é o caso dos padrões II/III de *Rsa*I.

Quadro 3.8. Padrões originados pelos fragmentos de restrição obtidos com cada endonuclease.

Endonucleases	<i>Bgl</i> I		<i>Bme</i> I 390		<i>Dde</i> I		<i>Hpa</i> II		<i>Rsa</i> I		<i>Vsp</i> I		<i>Pst</i> I	<i>Sfc</i> I	<i>Xap</i> I	
Padrões	I	II	I	II	III	I	II	III	I	II	IV	I	II	III	I	I
Fragmentos de restrição (pb)	447	258	411	288	447	319	419	240	410	287	447	350	253	210	253	160
	189		36*	123		100	28*	179	37*	123		60	194	197	146	150
						28*		28*		37*		37*	40*	48		137
			36*													90
																50

pb, pares de bases; *, fragmentos confirmados por sequenciação.

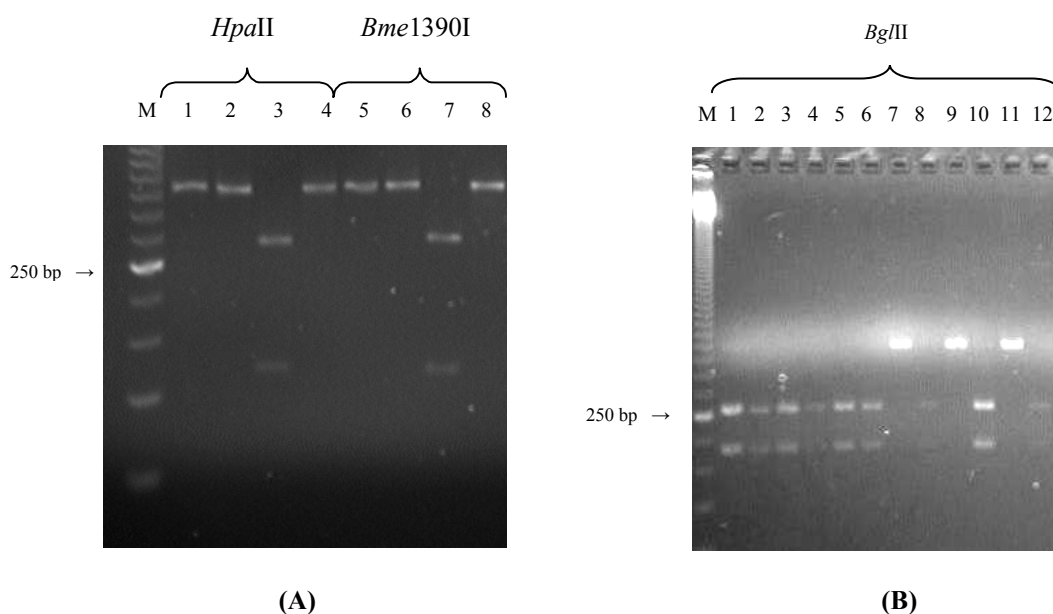


Figura 3.4. Exemplo de padrões de restrição obtidos com três das seis endonucleases, em algumas das amostras analisadas. **A.** Endonucleases *HpaII* e *Bme1390I*: Linhas 1, 2, 4, 5, 6 e 8, padrão I; Linhas 3 e 7, padrão II. **B.** Padrões de restrição obtidos com a endonuclease *BglII*: Linhas 7, 9 e 11, padrão I; Linhas 1 a 6, 8 e 10, padrão II. M, Marcador de massa molecular de 50 pb.

Efectuou-se uma análise combinada dos segmentos de restrição do kDNA obtidos com cada uma das seis enzimas polimórficas. No total foram definidos 16 perfis de restrição ou genótipos (A a P), (Quadro 3.9). De forma a confirmar os locais de restrição das endonucleases seleccionadas, sequenciaram-se dois produtos de amplificação correspondentes a cada genótipo definido. A análise daquelas sequências nucleotídicas permitiu identificar, com precisão, a dimensão dos fragmentos de restrição, visualizados em gel de agarose, cujos valores foram apresentados anteriormente no Quadro 3.8.

Quadro 3.9. Perfis de restrição ou genótipos obtidos.

Perfis/ Genótipos	Padrões de restrição originados pelas endonucleases					
	<i>Bgl</i> II	<i>Bme</i> I 390 I	<i>Dde</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Rsa</i> I	<i>Vsp</i> I
A	II	I	II	I	I	I
B	I	I	I	I	I	I
C	II	I	III	I	I	I
D	I	II	I	II	I	I
E	I	I	II	I	I	I
F	I	I	I	IV	I	I
G	I	I	I	I	II	II
H	II	I	I	I	II	II
I	II	I	I	I	I	II
J	I	I	I	I	III	I
K	I	III	I	III	I	I
L	I	II	I	II	III	I
M	I	III	I	IV	II	I
N	I	I	I	III	I	I
O	I	I	I	I	I	II
P	I	I	I	I	I	III

Foi, ainda, testada a estabilidade dos perfis obtidos com PCR-RFLP de kDNA, utilizando quatro pares de estirpes de *L. infantum* MON-1, contendo, cada par, o isolado original (criopreservado) e o mesmo isolado após longos períodos de cultura *in vitro* (três a cinco anos). Em três dos quatro pares não foram observadas diferenças nos padrões de hidrólise após longos períodos de passagens *in vitro*. Num caso detectou-se um genótipo diferente (B) ao fim de cerca de cinco anos de passagens de cultura *in vitro* em relação ao genótipo original (A). A distinção entre os dois genótipos foi devida a diferenças nos padrões de hidrólise de duas endonucleases (*Bgl*II e *Dde*I), ou seja, relativamente ao isolado original, houve perda do local de restrição da enzima *Bgl*II e para a enzima *Dde*I, ocorreu alteração na sequência originando um local de corte adicional.

Na população portuguesa identificou-se um total de 13 perfis, de A a M (Quadro 3.10). O perfil A predominou, identificando-se em 69 dos 134 isolados (51,5%), e foi exclusivo dos isolados portugueses, assim como outros sete perfis (C, D, H, I, J, L e M)

menos frequentes. O perfil B foi o segundo mais frequente, encontrado em 41 dos 134 (30,6%) isolados provenientes do país. A frequência dos restantes perfis encontrados variou de 5,2% (7/134) a 0,7% (1/134).

Quadro 3.10. Frequência absoluta (F) e relativa (f) dos diferentes perfis genotípicos encontrados na população parasitária portuguesa.

Perfis	Frequências	
	F	f (%)
A	69	51,5
B	41	30,6
C	2	1,5
D	5	3,7
E	7	5,2
F	2	1,5
G	1	0,7
H	1	0,7
I	1	0,7
J	1	0,7
K	1	0,7
L	2	1,5
M	1	0,7
Total	134	100

Relativamente à distribuição geográfica dos perfis genotípicos obtidos, a região Metropolitana de Lisboa apresentou uma maior diversidade com nove perfis diferentes (Quadro 3.11). Na região do Alto Douro identificaram-se cinco perfis, três perfis na região do Alentejo e quatro no Algarve. Os dois isolados do vector *Ph. ariasi* do Alto Douro foram identificados com os perfis A e B. A terceira amostra isolada do vector (*Ph. perniciosus*), no Algarve, foi identificada como perfil J. Os quatro isolados de raposas, todas provenientes da RML, foram identificados dois como perfil A e dois como perfil B.

Quadro 3.11. Distribuição geográfica dos 13 perfis de restrição identificados nas amostras portuguesas.

Regiões geográficas						
Perfis	Alto Douro		RML e Centro		Alentejo	Algarve
	A (4)	K (1)	A (58)	F (2)	A (7)	B (1)
	B (9)		B (29)	G (1)	B (2)	E (3)
	D (3)		C (1)	L (2)	C (1)	H (1)
	I (1)		D (2)	M (1)		J (1)
			E (4)			

Entre parêntesis encontra-se o número de isolados identificados em cada perfil.

Nos isolados humanos (Quadro 3.12), foram identificados sete perfis em 18 isolados de *L. infantum* de imunocompetentes e oito perfis em 46 isolados de indivíduos imunodeprimidos. Em relação aos dois genótipos mais frequentes, A e B, observou-se uma associação estatisticamente significativa com o estado imunitário dos indivíduos, ou seja, os doentes imunodeprimidos estão associados ao perfil A e os imunocompetentes ao perfil B ($p = 0,024$).

Quadro 3.12. Distribuição dos perfis de restrição nos isolados humanos de acordo com o seu estado imunitário.

Perfis	Imunocompetentes (n= 18)	Imunodeprimidos (n= 46)
A	4 (3LV; 1LC)	28 (25LV; 1LC; 2LVC)
B	9 (7LV; 2LC)	8 (6LV; 1 LC; 1LVC)
C	1 (1LV)	1 (1LV)
D	1 (1LC)	1 (1LV)
E	0	3 (3LV)
F	0	2 (2LVC)
G	0	1 (1LV)
H	1 (1LC)	0
I	1 (1LV)	0
K	1 (1LC)	0
L	0	2 (2LV)

Entre parêntesis encontra-se o número de isolados correspondente a cada forma LV, leishmaniose visceral; LC, leishmaniose cutânea; LVC, leishmaniose viscerocutânea.

As 64 amostras portuguesas de isolados humanos incluem amostras correspondentes a 16 casos de recidivas relacionadas com 12 doentes imunocomprometidos pela co-infecção com o VIH. Destes 12 doentes, 11 apresentaram o mesmo genótipo, quer no primeiro episódio, quer nos seguintes. Um doente apresentou um genótipo (B) no primeiro episódio e um outro genótipo na recidiva (A), correspondendo este último episódio a uma forma viscero-cutânea. Em dois destes 12 doentes a forma clínica evoluiu de LV para LVC, no segundo episódio. Num outro doente imunocomprometido a forma clínica evoluiu de LV para um quadro semelhante a PKDL, no segundo episódio, apresentando o genótipo A em ambos os episódios.

No Quadro 3.13 encontra-se a distribuição dos perfis genotípicos do grupo de amostras provenientes de outros países da bacia mediterrânica, de África Oriental e Brasil. Neste grupo de amostras há que realçar a inexistência do perfil A, o mais frequente (51,4%) nas amostras portuguesas. Cerca de metade dos genótipos encontrados em Portugal foram identificados noutros países, ao contrário do genótipo A, que é o mais frequente e exclusivo em Portugal.

Quadro 3.13. Distribuição geográfica dos perfis de restrição identificados nas amostras de outros países.

Perfis	Países						
	Espanha	França	Grécia	Malta	Sudão	Etiópia	Brasil
	B (3)	K (2)	B (3)	O (1)	G (2)	G (3)	B (7)
	N (2)	F (1)	P (2)				E (1)

Dentro de parêntesis encontra-se o número de isolados identificados com cada perfil.

Quanto à distribuição dos diferentes genótipos relativamente aos zimodemes identificados, verificou-se que o zimodeme MON-1, o mais comum, se dividiu em 12 perfis diferentes com predominância dos perfis A e B (Quadro 3.14). O genótipo H observou-se apenas num isolado de *L. infantum* MON-29 e o F em outros dois MON-29 e num isolado MON-11 de França. O genótipo N apenas foi identificado em duas amostras caninas de

MON-1 provenientes de Espanha e o genótipo O numa amostra humana MON-78 de Malta. Três amostras da Grécia apresentaram também um genótipo exclusivo (P), duas pertencentes ao zimodeme MON-1 (uma humana e uma canina) e outra ao zimodeme MON-98 (humana); duas outras estirpes gregas, uma MON-1 e outra MON-98, apresentaram genótipo B. Todas as amostras proveniente do Brasil, com excepção de uma que apresentou o perfil E, apresentaram o perfil B, sendo este o segundo mais frequente em Portugal e também encontrado em Espanha e na Grécia. Todas as estirpes africanas de *L. donovani* (zimodemes MON-30, MON-31, MON-81, MON-82 and MON-18), bem como uma estirpe portuguesa zimodeme MON-24, apresentaram o mesmo perfil (G).

As três estirpes portuguesas MON-1 isoladas a partir do vector apresentaram genótipos diferentes: J, isolado de *Ph. perniciosus*, e A e B isolado a partir de *Ph. ariasi* do Alto Douro.

Quadro 3.14. Distribuição dos perfis de restrição e países de origem, de acordo com os zimodemes dos isolados.

Zimodemes	Origem geográfica	Perfis genotípicos
MON-1	Portugal	A (65)
		B (39)
		C (1)
		D (4)
		E (7)
		I (1)
		J (1)
		L (2)
		M (1)
	Espanha	B (3)
		N (2)
	França	K (2)
	Grécia	B (1)
		P (2)
MON-11	Brasil	B (7)
		E (1)
MON-11	França	F (1)
MON-18	Etiópia	G (1)
MON-24	Portugal	G (1)
MON-29	Portugal	F (2)
		H (1)
MON-30	Sudão	G (1)
MON-31	Sudão	G (1)
MON-78	Malta	O (1)
MON-81	Sudão	G (1)
MON-82	Etiópia	G (1)
MON-98	Grécia	B (1)
		P (1)

Entre parêntesis encontra-se o número de isolados identificados com cada perfil.

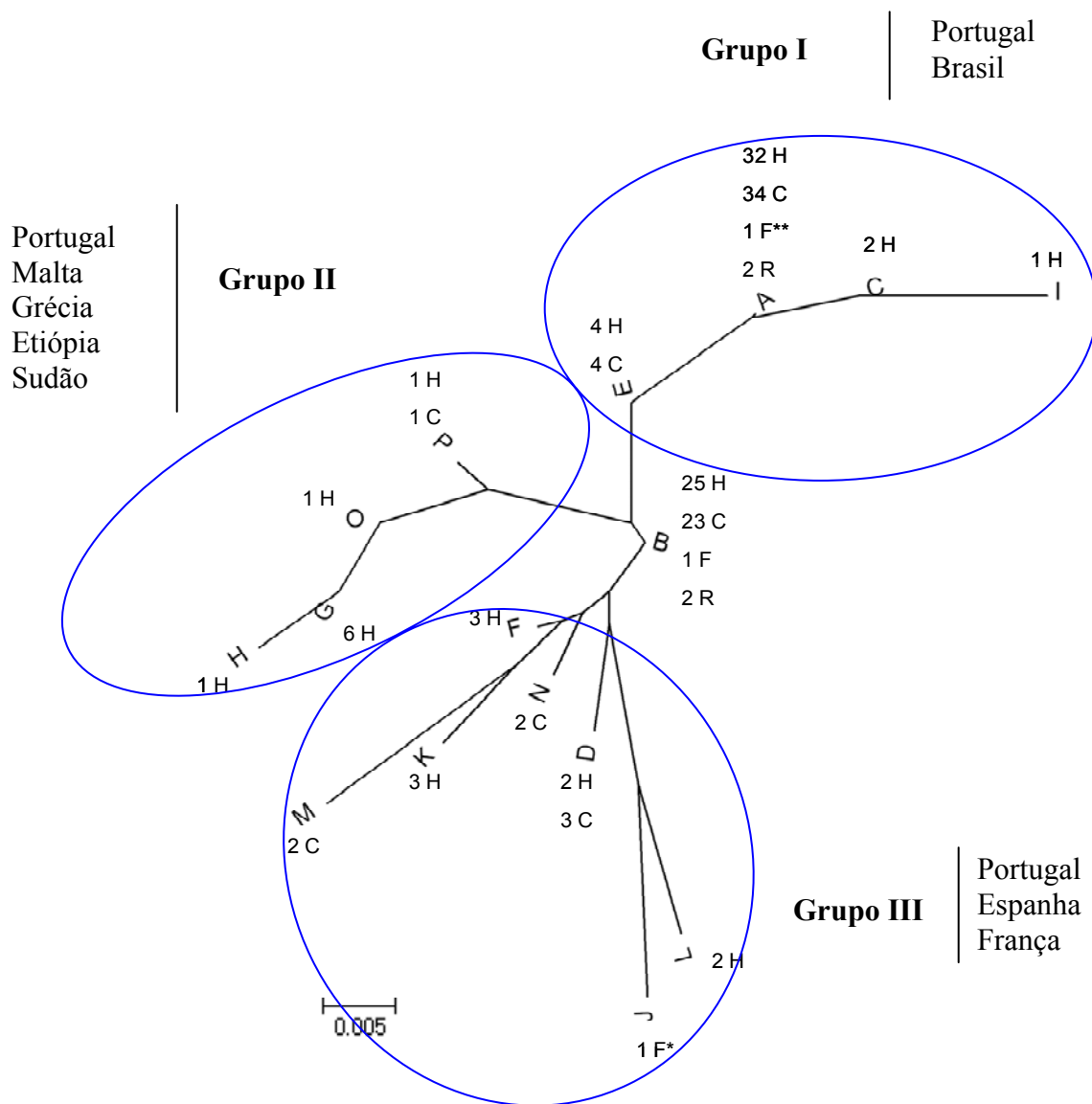


Figura 3.5. Dendrograma (“Neighbor-joining”) com base nas distâncias genéticas derivadas dos resultados de kDNA-PCR-RFLP (genótipos) de todas as amostras.

Junto a cada genótipo encontra-se o número de amostras humanas (H), caninas (C), raposa (R) e flebótomos (F). *, *P. ariasi*; **, *P. perniciosus*.

Da análise numérica das distâncias genéticas obtidas com os resultados do método kDNA-PCR-RFLP, construiu-se um dendrograma sem raiz (Figura 3.5). A análise de “bootstrap” não foi apresentada, uma vez que os valores se revelaram inferiores a 70%. Como se pode observar, os isolados de *L. infantum* ficaram divididos em três grandes agrupamentos, com o genótipo B, um dos mais frequentes nas amostras portuguesas, situado na base dos três grupos. O agrupamento I é formado pelos genótipos E, A, C e I que, à excepção de uma amostra brasileira (no genótipo E), apenas foram identificados em Portugal e todos tipados como MON-1. No agrupamento II, encontra-se o genótipo G, no qual estão incluídas as estirpes de *L. donovani s.l.* provenientes de África Oriental bem como uma estirpe portuguesa MON-24 e outros genótipos de amostras predominantemente não-MON-1, tais como: o genótipo H, correspondente a uma estirpe portuguesa MON-29 (considerada como dermatrópica), o genótipo O, encontrado na estirpe dermatrópica de Malta MON-78 e o genótipo P que inclui uma estirpe grega MON-98. O agrupamento III é mais diverso, com sete genótipos diferentes, e inclui apenas estirpes europeias, essencialmente MON-1.

A estirpe portuguesa que foi identificada por MLEE e MLST como híbrido de *L. infantum/L. major* (H7), foi, neste estudo, identificada com o genótipo B. As amostras portuguesas correspondentes a duas novas variantes isoenzimáticas de zimodemes, foram identificadas com o genótipo B e C.

3.4 Discussão

Neste trabalho foi avaliada a aplicação da reacção de PCR com sequências iniciadoras, MC1 e MC2, que foram seleccionadas tendo como alvo molecular uma sequência de DNA cinetoplastideal de *L. infantum s.l.*, para diagnóstico e genotipagem. Foi determinada a sua especificidade e sensibilidade para uso em diagnóstico. Foi igualmente validada a estabilidade do marcador molecular, DNA cinetoplastideal. Os produtos de PCR resultantes das amostras dos casos de infecção por *Leishmania* em humanos, caninos e

vectores isoladas em Portugal, foram avaliados em relação à existência de diversidade genética, aplicando a técnica de RFLP.

Verificou-se que as sequências iniciadoras MC1 e MC2 apresentaram uma elevada especificidade, uma vez que a PCR aplicada a outros microorganismos e hospedeiros não infectados e com estirpes do complexo *L. donovani*, não amplificou o DNA (Cortes *et al.*, 2004). Alguns dos microorganismos testados, nomeadamente *P. carinii*, *M. tuberculosis* e *M. avium* são frequentemente causadores de infecções concomitantes em doentes imunocomprometidos infectados com *Leishmania* (WHO, 2000), daí a particular importância do grau de especificidade das sequências iniciadoras no diagnóstico da leishmaniose, nomeadamente em doentes infectados com o VIH. De igual modo é relevante a elevada especificidade das sequências iniciadoras no diagnóstico de leishmaniose em doentes que vivem em regiões geográficas onde outras parasitoses são endémicas, podendo ocorrer infecções mistas, tais como os casos descritos de leishmaniose associada a malária ou a doença de Chagas em países da América do Sul (Sah *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2001). Esta última associação é particularmente importante, uma vez que existe uma proximidade filogenética dos parasitas *T. cruzi* e *Leishmania* (Van Eys *et al.*, 1992). Os resultados apresentados provam também que as sequências iniciadoras MC1/MC2 são específicas para *L. donovani* s.l. do Velho e Novo Mundo.

Neste trabalho, comparativamente aos resultados obtidos com o par de “primers” AJS1/DB8 (Smyth *et al.*, 1992), os “primers” MC1/MC2 mostraram uma sensibilidade mais elevada, com um limite de detecção superior. Outros autores, utilizando o par das sequências iniciadoras AJS1/DB8 observaram uma elevada sensibilidade na detecção de *L. donovani*, no diagnóstico da LV em doentes do sub-continente indiano (Smyth *et al.*, 1992). Contudo, no nosso estudo não foi feita a comparação entre os pares de “primers” e as duas populações. Verificou-se com os “primers” AJS1/DB8 a existência de bandas inespecíficas, revelando baixa especificidade, no que se refere à amplificação de outras espécies de *Leishmania* (dados não apresentados).

O kDNA tem sido extensivamente aplicado como alvo molecular quer no diagnóstico, quer na identificação e genotipagem de diferentes espécies de *Leishmania* (Noyes *et al.*, 1998; Berzunza-Cruz *et al.*, 2000; Ferroglio *et al.*, 2006).

A estabilidade do kDNA como marcador molecular, foi testada com o método PCR-RFLP, utilizando quatro pares de isolados originais e após longos períodos de cultura *in vitro*. Três destes pares mostraram o mesmo genótipo, mostrando uma relativa estabilidade do kDNA. Num par observou-se um perfil diferente entre o primeiro isolado e o segundo, que foi sujeito a cerca de 5 anos de passagens em cultura *in vitro*, indicando que, provavelmente, esta estirpe poderá ter sofrido mutações na sequência de kDNA ou alterações na frequência das várias classes de minicírculos existentes. Estas mudanças poderão ser devidas a pressões causadas por longos períodos de culturas. Alguns autores provaram que o genoma cinetoplastideal pode mudar, em termos de frequência das classes de minicírculos, quando sujeito à exposição de fármacos *in vitro* (Lee *et al.*, 1993). Adicionalmente a existência de heterogeneidade das sequências de kDNA em diferentes estirpes da mesma espécie tem sido reportada por diversos autores (Noyes *et al.*, 1998). Por outro lado, evidências relativamente recentes mostraram que locais de restrição utilizados numa análise de PCR-RFLP das principais classes de minicírculos são conservados durante um considerável período de tempo, isto é de 2 a 3 anos (Lambson *et al.*, 2000). No nosso estudo a estirpe tinha sido sujeita a culturas sucessivas por um período de cinco anos.

Neste estudo verificou-se uma considerável estabilidade nos minicírculos de isolados sequenciais, antes e após tratamento. Os resultados obtidos na análise do DNA de estirpes isoladas em 12 doentes imunodeprimidos com várias recidivas, revelando o mesmo perfil nos vários episódios em 11 deles, sugerem que as recidivas poderão corresponder a recaídas conforme sugerido por Morales *et al.*, (2002). No entanto, há que ter em consideração que nos vários episódios, os dois genótipos mais encontrados foram os mais frequentes (A e B), havendo uma probabilidade elevada de que, no caso de haver uma re-infecção, o parasita isolado possua também genótipo A ou B. Nestes indivíduos imunocomprometidos e dependentes de drogas endovenosas, aumenta o risco de re-infecções, uma vez que estes têm, por hábito, a partilha de seringas que funcionam como um substituto mecânico do vector natural (o flebótomo), servindo de reservatório também no ciclo natural antroponótico (Cruz *et al.*, 2002). No entanto, não poderá ser descartada a hipótese de o indivíduo ter tido uma primeira infecção por uma população mista (ou

parasitas com diferentes frequências nos minicírculos) e que um genótipo menos frequente se tenha tornado dominante após a selecção provocada pelo tratamento.

Neste estudo, avaliou-se a diversidade genética de isolados portugueses de *L. infantum*, aplicando a técnica de PCR-RFLP numa sequência de kDNA. Combinando os diferentes padrões de restrição obtidos nas amostras da população parasitária de *L. infantum* em Portugal, observou-se um número relativamente alto de genótipos (13). Não se observou qualquer associação entre isolados dos diferentes focos endémicos ou do hospedeiro. Nos genótipos mais frequentes (A e B) estavam incluídas amostras das diferentes regiões do país e dos diferentes hospedeiros e vector. No entanto, foi possível observar uma associação dos dois perfis genotípicos mais frequentes com o estado imunitário dos doentes: o perfil genotípico A correlacionou-se com os doentes imunocomprometidos co-infectados com VIH e o perfil B associado aos doentes imunocompetentes. Há que notar que a maioria das amostras que originaram o perfil A, eram provenientes da região de Lisboa e de indivíduos infectados pelo VIH, dependentes de drogas endovenosas, residentes em comunidades fechadas da cidade de Lisboa. Este facto poderá sugerir que as estirpes circulantes nos indivíduos VIH positivos podem ter sofrido um efeito fundador ou mesmo expansão clonal, ou seja, poderá ter ocorrido a propagação de um número reduzido de clones, com um determinado genótipo nesta comunidade. Contudo, esta hipótese terá que ser testada com um estudo mais alargado.

Observou-se também, uma diversidade de genótipos no zimodeme MON-1. Esta diversidade foi igualmente observada por outros autores utilizando para além do kDNA outros marcadores moleculares, nomeadamente regiões inter e intra-génicas da proteinase B cisteína (CPB) e regiões de microssatélites (Hide *et al.*, 2001; Botilde *et al.*, 2006; Kuhls *et al.*, *em publicação*).

Os genótipos do agrupamento ou grupo I (A, E, C e I) foram apenas identificados na população portuguesa, à excepção de uma amostra proveniente do Brasil. Este facto poderá levantar a hipótese de que estes genótipos tenham evoluído em Portugal continental.

O grupo II inclui estirpes de outros países, predominantemente não-MON-1, nomeadamente estirpes de *L. infantum* MON-98 e MON-78 de Grécia e Malta, respectivamente, e isolados provenientes da África Oriental que, apesar de pertencerem a

diferentes espécies e zimodemes (*L. infantum* MON-81, *L. donovani* MON-18, MON-30 e MON-31 e *L. archibaldi* MON-82) (Pratlong *et al.*, 2001), revelaram todos o mesmo perfil G, tendo também sido considerado como grupo externo (“outgroup”) na análise filogenética (Cortes *et al.*, 2006). Este facto vem corroborar outros estudos que identificaram as estirpes africanas da Etiópia e Sudão como um grupo genético único. Segundo os autores daqueles estudos, as estirpes de África Oriental devem ser classificadas como *L. donovani*, uma vez que apresentam características moleculares comuns (Maurício *et al.*, 2001, 2006; Zemanova *et al.*, 2004; Khuls *et al.*, 2005; Haralambous *et al.*, 2007).

Uma estirpe *L. infantum* MON-24, isolada a partir de um indivíduo imunodeprimido foi identificada com o mesmo genótipo das estirpes africanas. Esta observação vem ao encontro de outro estudo em que se observou que as estirpes do zimodeme MON-24 formam duas populações distintas. Haralambous *et al.* (2007) verificaram que estirpes MON-24 provenientes da Argélia e de Portugal se enquadram num mesmo agrupamento juntamente com estirpes MON-1 e a outra população num agrupamento diferente com estirpes de *L. donovani s.l.* africanas. Noutro estudo com a aplicação de PCR-RFLP e utilizando como marcador molecular o gene da glicoproteína de 63 kDa (gp63), foi observado que cinco estirpes de MON-24 da Argélia se agruparam com estirpes de *L. donovani* africanas e outras duas, provenientes de Espanha e Argélia, se agruparam com estirpes MON-1 (Guerbouj *et al.*, 2001). O zimodeme MON-24 tem sido considerado um zimodeme dermatrópico no entanto, já foram descritos casos de LV em doentes imunocomprometidos (Alvar, 1990; Campino *et al.*, 1995; Pratlong *et al.*, 1995) e em crianças imunocompetentes (Benikhlef *et al.*, 2001). Este zimodeme já foi encontrado também no vector, nomeadamente em *Ph. ariasi* em Portugal e em *Ph. ariasi* e *Ph. perniciosus* em Espanha (Pires *et al.*, 1991; Martin-Sanchez *et al.*, 2004). Apesar de a descoberta de cães infectados com este zimodeme no norte de África, em Argélia e Marrocos (Benikhlef *et al.*, 2001; Haralambous *et al.*, 2007), não se pode inferir que o cão seja o reservatório deste zimodeme, ou apenas um hospedeiro accidental. O facto de a estirpe portuguesa MON-24 se encontrar no mesmo agrupamento das estirpes africanas poderá ser explicado por esta estirpe ter sido isolada de um indivíduo consumidor de drogas endovenosas, e tenha sido importada de outro país, ou que o genótipo resulte de

recombinação genética com *L. donovani*. Os genomas mosaico já foram reportados no complexo *L. donovani* (Maurício *et al.*, 2006).

O grupo III apresenta maior heterogeneidade (diversos ramos), apesar de incluir uma amostra *L. infantum* MON-29 portuguesa e uma MON-11 de França, que tem sido referida por outros autores como sendo geneticamente distante das restantes *L. infantum* (Zemanova *et al.*, 2004), este agrupamento é predominantemente composto por amostras de *L. infantum* MON-1 de Portugal, Espanha e França. Poder-se-á sugerir que estes perfis, de casos isolados no nosso país, tivessem evoluído fora de Portugal e introduzidos posteriormente no país. Para que estas hipóteses possam ser validadas há que realizar o estudo num número de amostras portuguesas muito mais abrangente e de outros países da bacia mediterrânica.

A presença do genótipo B (um dos mais frequentes na população portuguesa, a seguir ao A) na maioria das amostras provenientes do Brasil, vem reforçar a evidência de que *L. infantum* do Velho Mundo e do Novo Mundo são a mesma entidade como anteriormente referido. No entanto, apesar do número de amostras provenientes do Brasil ser reduzido, há que referir a ausência do perfil A o que poderá indicar que a população parasitária de *Leishmania* de Portugal não estará na origem de *L. chagasi* ou a expansão clonal que deu origem ao genótipo A terá sido muito recente.

No presente estudo foi igualmente observado que quase todas as estirpes de *L. infantum* consideradas dermatrópicas possuem genótipos filogeneticamente próximos (perfis genotípicos H, O e G). Esta observação foi similar à verificada por Angelici *et al.* (1989) que, aplicando kDNA-RFLP, a 29 estirpes, mostraram que estirpes dermatrópicas de *L. infantum* eram geneticamente divergentes das viscerotrópicas.

A estirpe híbrida *L. infantum*/*L. major* apresentou um dos genótipos (B) mais comuns à maioria dos isolados portugueses de *L. infantum* MON-1. Como anteriormente referido por Ravel *et al.* (2006), esta mesma estirpe apresenta os dois genomas, de *L. infantum* e *L. major*. Uma vez que as sequências iniciadoras MC1/MC2 não amplificam *L. major*, poder-se-á concluir que foi determinado apenas uma sequência do genoma de *L. infantum*.

Três genótipos diferentes foram identificados nas amostras provenientes de três flebótomos, dois de *Ph. ariasi* e um de *Ph. perniciosus*. Dois dos genótipos identificados são os mais frequentes em Portugal, A e B, também encontrados tanto em humanos como em cães, na região do Alto Douro, confirmando-se o ciclo de transmissão pelo menos naquele foco, relativamente a estes genótipos, tal como anteriormente observado em relação a *L. infantum* zimodeme MON-1 (Campino *et al.*, 2006).

Todos os resultados apresentados sugerem que Portugal, considerado até agora homogéneo ou pouco variável no que respeita aos zimodemes de *Leishmania* responsáveis pela leishmaniose, quer visceral, quer cutânea, apresenta, na realidade, uma maior diversidade, que vem sendo demonstrada com a aplicação e avanço das metodologias moleculares, nomeadamente com a utilização do PCR-RFLP.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LEISHMANIA POR ANÁLISE DE MICROSSATÉLITES

4. Caracterização molecular de *Leishmania* por análise de microssatélites

4.1 Introdução

Presentemente encontra-se descrito um elevado número de métodos moleculares para a caracterização de *Leishmania* desde o género até ao nível da estirpe, com a utilização de diferentes sequências do DNA parasitário como marcadores. Diversos estudos moleculares têm documentado a existência de variabilidade intra-específica em diferentes espécies de *Leishmania* (Schönian *et al.*, 1996; Cupolillo *et al.*, 1995; Maurício *et al.*, 2001). Ao contrário de *L. donovani* e *L. tropica*, que apresentam elevados polimorfismos genéticos e enzimáticos (Lewin *et al.*, 2002; Schönian *et al.*, 2001), *L. infantum* é uma espécie relativamente uniforme, em que mais de 80% das estirpes isoladas pertencem a um zimodeme predominante, o MON-1 (Pratlong *et al.*, 1995, 2004; Campino *et al.*, 2006). A técnica de electroforese enzimática multilocus (MLEE), que é considerada como a técnica de referência na diferenciação das estirpes, diferencia grupos de populações de *Leishmania* com o mesmo perfil enzimático, mas não permite uma diferenciação dentro do mesmo. Para além disso, como referido anteriormente (Capítulo 1.7), a MLEE apresenta uma série de desvantagens no que respeita à execução da técnica. Em alternativa têm sido aplicados diferentes métodos e alvos moleculares, com maior ou menor poder discriminatório, para discriminação entre espécies e/ou estirpes, tais como polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) de kDNA, de genes que codificam para proteínas antigénicas (Chicharro *et al.*, 2003; Quispe-Tintaya *et al.*, 2004), DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) (Hide *et al.*, 2001; Zemanová *et al.*, 2004) e cariotipagem molecular (Gerbouj *et al.*, 2001).

Apesar de estarem disponíveis vários métodos moleculares para a caracterização de *Leishmania*, há falta de standardização, e a maioria não se aplica ao estudo da genética de populações, nomeadamente heterozigotia e recombinação (Schönian *et al.*, 2008).

Assim, existe presentemente a necessidade de se desenvolverem metodologias aplicadas à avaliação da heterogeneidade dos parasitas *Leishmania*, e de um modo especial *L. infantum*, que possibilitem uma análise mais discriminatória das populações de *Leishmania*.

Os microssatélites, sequências de DNA bastante abundantes no genoma de *Leishmania*, têm-se revelado ferramentas moleculares bastante promissoras. Apesar de não existirem muitos estudos, a análise de polimorfismos de fragmentos de DNA em regiões que contenham microssatélites, através da técnica de tipagem de microssatélites multilocus (MLMT), tornou-se uma ferramenta importante para diferenciação intra-específica dos parasitas *Leishmania*, e um excelente método de estudos epidemiológicos, bem como de estudos de genética de populações (Kuhls *et al.*, 2005, 2007; Ochsenreither *et al.*, 2006).

Os microssatélites são sequências de pequeno tamanho, compostas por um a seis pares de bases, repetidas sucessivamente. Encontram-se quer nos genomas procariotas quer nos eucariotas, sendo ubíquos nestes últimos, tanto em regiões codificantes como em não codificantes, embora sejam menos frequentes nas primeiras (Tóth *et al.*, 2000). São altamente polimórficos, com um relógio molecular rápido em que a sua taxa de mutação é cinco a seis vezes maior que o restante DNA. Os *loci* de microssatélites apresentam uma grande variabilidade devido a alterações no número das repetições resultantes num mecanismo designado por deslizamento (“slipage”) do DNA, um erro que ocorre durante a replicação do DNA, com adição ou remoção de unidades de repetição. A variação de comprimento de *loci* individuais pode ser facilmente identificada por diferentes metodologias, após amplificação por PCR com sequências iniciadoras que se ligam às regiões dos flancos, sendo necessárias quantidades muito pequenas de DNA. Os resultados são igualmente reprodutíveis e comparáveis entre laboratórios (Schwenkenbecher *et al.*, 2004; Ochsenreither *et al.*, 2006). Os microssatélites são marcadores neutros, ou seja, não estão sujeitos a selecção natural, e são codominantes, em que os *loci* heterozigóticos

conseguem distinguir-se dos homozigóticos. Por outro lado, a homoplasia deste marcadores pode subestimar a divergência genética.

Devido à elevada mutação nos locais de ligação das sequências iniciadoras, nas regiões que flanqueiam os microssatélites, e as repetições não serem conservadas entre diferentes espécies de *Leishmania* (Jamjoom *et al.*, 2002, Schwenkenbecher *et al.*, 2004), há que desenvolver um painel de 10 a 20 marcadores de microssatélites para quase todas as espécies de *Leishmania* (Jamjoom *et al.*, 2002), de forma a conseguir-se uma maior distinção entre as estirpes. Consequentemente este facto poderá levar a um considerável aumento do tempo de execução e custo monetário dos ensaios com microssatélites (Botilde *et al.*, 2006).

Nos últimos cinco anos têm sido desenvolvidos painéis de microssatélites para aplicação em diferentes espécies do género *Leishmania*, nomeadamente três *loci* de microssatélites para análise da variação em *Leishmania* do sub-género *Viannia* (Russel *et al.*, 1999), 13 *loci* para *L. major* (Jamjoom *et al.*, 2002), 16 para *L. tropica* (Schwenkenbecher *et al.*, 2004), 20 para *L. donovani* (Jamjoom *et al.*, 2002a), 15 *loci* para o complexo *L. donovani* (Kuhls *et al.*, 2007), 10 *loci* identificados no genoma de *L. infantum* (Bulle *et al.*, 2002) e 14 microssatélites para diferenciação entre populações de *L. infantum* MON-1 (Kuhls *et al.*, em publicação).

A análise do tamanho das sequências de microssatélites pode ser feita através de várias metodologias. Ochsenreither *et al.*, (2006) utilizaram três métodos diferentes para análise dos microssatélites: i) electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), ii) electroforese em gel de agarose de elevada resolução Metaphor® e iii) análise de fragmentos por metodologia fluorescente num sequenciador capilar automático, tendo-se os três métodos revelado adequados para a detecção de variações no tamanho de fragmentos.

O objectivo do presente estudo foi o de avaliar a diversidade genética de *L. infantum* de diferentes isolados provenientes do hospedeiro humano, reservatório e vector de diferentes regiões de Portugal, bem como de outros isolados de *L. infantum* proveniente de diferentes regiões da bacia mediterrânica, África Oriental e Brasil, pela técnica de análise de microssatélites, isto é, através da variação de tamanho das sequências de microssatélites. Posteriormente fez-se a correlação entre os padrões de microssatélites e a

especificidade do hospedeiro, forma clínica da doença e estado imunitário do hospedeiro humano.

4.2 Material e métodos

4.2.1 População estudada

Neste estudo foi analisado um total de 154 amostras de DNA de estirpes de *Leishmania*, 128 provenientes de diferentes regiões geográficas de Portugal (região do Alto Douro, região Centro, região Metropolitana de Lisboa (RML), Alentejo e Algarve), isoladas em casos de infecções humanas, caninas, em raposas e no vector. Estudaram-se paralelamente 26 amostras provenientes de casos de leishmaniose de outros países da bacia mediterrânica, de África Oriental e do Brasil. Estas amostras foram também analisadas por kDNA-PCR-RFLP (Capítulo 3).

Das amostras portuguesas, 60 foram isoladas a partir do hospedeiro humano (Apêndice 1). Do total das 60, 48 foram identificadas por MLEE como *L. infantum* MON-1, três como MON-29, uma como MON-24, duas como uma nova variante não identificada anteriormente, e duas como híbrido de *L. infantum*/*L. major*. Em quatro amostras a tipagem enzimática não foi efectuada. Neste grupo estão incluídos 49 casos de LV, seis de LC e cinco de LVC. Estas amostras são provenientes quer de doentes imunocompetentes quer de imunodeprimidos (dos quais 13 apresentaram recidivas), das diferentes regiões geográficas do país: 13 do Alto Douro, 39 da RML, dois da região Centro, dois do Alentejo, que correspondem às duas novas variantes enzimáticas, e quatro do Algarve.

Relativamente à LCan foram estudadas 59 amostras (Apêndice 2), provenientes da região do Alto Douro (3), RML (47), Alentejo (6) e Algarve (3). À excepção de duas amostras provenientes do Algarve, todas as outras foram também analisadas no capítulo 3. Todas as amostras foram tipadas como *L. infantum* MON-1.

Foram igualmente estudadas quatro estirpes de *L. infantum* MON-1 isoladas em raposas da RML e três isoladas a partir do vector, duas provenientes do Alto Douro e uma

do Algarve, já referidos nos sub-capítulos 3.2.1.2 e 3.2.1.3. Adicionalmente, neste capítulo, estudaram-se dois isolados em flebotomos, também provenientes do Alto Douro, que foram tipados por MLEE como *L. infantum* MON-24.

Adicionalmente foram caracterizadas 26 amostras de DNA de *Leishmania* de países da bacia mediterrânica (cinco de Espanha, três de França, cinco da Grécia e uma de Malta), de África (três da Etiópia e duas do Sudão) e sete do Brasil, identificadas por tipagem isoenzimática como *L. infantum* e *L. donovani*, tal como descritas no Quadro 6 do sub-capítulo 3.2.1.4.

À excepção das amostras do Brasil e da Grécia, as restantes 15, foram consideradas como amostras-referência na análise electroforética, uma vez que já era conhecido o tamanho dos alelos dos microssatélites estudados, por clonagem e sequenciação prévia (Ochsenrither *et al.*, 2006)¹.

Para testar a estabilidade dos microssatélites, utilizaram-se quatro pares de estirpes de *L. infantum* MON-1 (IMT 151, IMT 163, IMT 184 e IMT 205), correspondendo, em cada par, ao isolado original e após longos períodos de cultura *in vitro* (de três a cinco anos) ou passagem por animal.

Avaliou-se a caracterização genética de *L. infantum* com a aplicação directa dos marcadores em amostras biológicas humanas e caninas, sem a necessidade de isolar os parasitas em cultura, utilizando-se duas amostras de medula óssea e duas amostras de pele de doentes com LV e LC confirmadas, respectivamente, bem como três amostras de sangue periférico de dadores portugueses. A amplificação das sequências dos microssatélites foi igualmente testada em cinco amostras biológicas caninas, de medula óssea e fígado de cães portugueses, que tinham comprovadamente LCan², três sintomáticos e dois assintomáticos. Paralelamente utilizaram-se amostras de medula óssea e fígado de dois cães não infectados³.

¹ Clonagem e sequenciação efectuadas pelo grupo da Doutora Gabriele Schönián, no “Laboratory of Molecular Parasitology, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité Universitätsmedizin”, Berlim, Alemanha.

² Cães diagnosticados no âmbito do inquérito epidemiológico canino apresentado no Capítulo 2.

³ Cães sem sinais clínicos de doença e negativos em três técnicas de diagnóstico: PCR, IFI e CIE.

4.2.2 Avaliação da especificidade das sequências iniciadoras dos *loci*

Avaliou-se a especificidade dos microssatélites seleccionados, utilizando um grupo de amostras de DNA, de diferentes espécies de *Leishmania* e de outros parasitas protozoários: *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. major*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Pneumocystis carinii* e *Cryptosporidium sp.* O DNA dos três últimos protozoários foi extraído a partir de tecidos infectados com estes parasita, enquanto que no caso dos outros foi a partir de culturas *in vitro*.

4.2.3 Extracção do DNA

A extracção de DNA a partir das amostras clínicas (aspirado de medula óssea, de gânglio linfático ou biópsia de pele) ou cultura de *Leishmania*, foi realizada com o “kit” comercial “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche), como referido anteriormente (sub-capítulo 3.2.2). O DNA extraído foi conservado a -20°C até posterior utilização.

4.2.4 Amplificação do DNA

Amplificou-se por PCR 13 *loci* (ou marcadores) contendo microssatélites, polimórficos para *L. infantum*, e analisou-se o tamanho dos fragmentos amplificados. No Quadro 4.1 encontram-se detalhadas as sequências iniciadoras utilizadas para os 13 *loci*.

Quadro 4.1. Sequências iniciadoras utilizadas, unidade de repetição e a sua localização.

Locus ^a	Sequências iniciadoras (5'- 3')		Unidade de repetição ^c	Tamanho do fragmento (pb) ^c	Cromossoma ^b	Ref ^a
	"forward"	"reverse"				
Lm2 (Lm2TG)	AAAAAGCGAGGAATGAAAGAA	TCCCTCCCCTCTACAACTT	(TG)10-26	110-144	1	
Lm4 (Lm4TA)	TTTGCCACACATACACTTAG	GTAGACGACATCGGAGCAC	(TA)8-14	71-83	1	
B (Li41-56)	TTGCTTCATGATAACAACCTTGG	CCTGTGTGTGTGAGTTCTGTG	(CA)9-12	88-94	36	
C (Li46-67)	TCTTCTTTCGTTAGCTGAGTGC	CTGTATCACCCATGAGGGGC	(CA)6-9	74-80	31	
E (Li22-35)	CTTGATGTTGGGTTAGCAAGT	ATGCACACCAAAAATCATGTG	(CA)5-23	78-114	n.i.	Ochsenreither <i>et al.</i> (2006)
F (Li23-41)	GATCGGAGGTGACAGCGT	CCTTTAAGTCCAGTGGC	(GT)6-27	65-107	25	
G (Li45-24)	GCGCCTACAGGCATAAAGGA	CTGGCGCATCAACGGTGT	(CA)7-20	89-115	16	
P (Li71-33)	CTCCTTTTCACACCGCTCT	GAGAGAAAGACGAGCCGAAGT	(TG)8-25	99-133	31	
Q (Li71-5/2)	GCACGGTCGGCATTTGTA	GATAAACGAGATGGCCGC	(CA)7-9	106-110	35	
R (Li71-7)	GCTGCAGCAGATGAGAAAG	GTGAGAAGGACAGGATTCAA	(CA)9-13	92-100	n.i.	Schönan (comunicação pessoal)
O	GGTTTGTACTCTTGTTGCTTC	TTGAATGGTGCCTGTGGT	(AC)10-11	116-118	n.i.	
KL1ST7031	CCACTGGTGAATAAGAAAGACT	GGAGAACTAAACGACAGCA	(CA)10-30	87-113	n.i.	
KL1ST7039	CTCGCACTCTTTCGCTCTT	GAGACGAGAGGAACGGAAAA	(CA)8-17	191-211	31	Kuhls <i>et al.</i> (2007)

^a as designações entre parêntesis correspondem às referidas em Ochsenreither *et al.* (2006).^b , localização baseada nas sequências correspondentes de *L. major* encontradas na base de dados genómica.^c , baseado nas amostras sequenciadasⁿ número de repetições da unidade de repetição, que é variável.

"forward", sequência iniciadora a jusante da região a estudar.

"reverse", sequência iniciadora a montante da região a estudar.

pb, pares de bases; n. i., não identificado.

As condições de PCR utilizadas foram optimizadas no “Laboratory of Molecular Parasitology, Institut für Mikrobiologie und Hygiene”, Berlim (Ochsenrither *et al.*, 2006). As reacções de amplificação foram efectuadas num volume de 50 µl contendo 1X tampão de reacção (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl [pH 8,8], 0,1% Tween-20) (Bioline), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de uma mistura dos desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Bioline), 1 U de *Taq* DNA Polymerase (Bioline) e concentração de sequências iniciadoras consoante o *locus* analisado: 10 pmol de cada um dos oligonucleótidos iniciadores dos marcadores B, C, E, F, G, O, P, Q, R, kLIST7031 e kLIST7039; 25 pmol de cada um dos oligonucleótidos iniciadores do marcador Lm2; 15 pmol de cada um dos oligonucleótidos iniciadores do marcador Lm4 (Thermo). Nas reacções de PCR em que os produtos de amplificação se destinaram à análise por fluorescência, a sequência iniciadora “forward” de cada marcador foi sintetizada com um fluorocromo incorporado na extremidade 5’, para a utilização no aparelho CEQ 8000 (Beckman Coulter, Fullerton, USA). Em cada reacção de amplificação utilizou-se 10-30 ng de DNA genómico e água ultra-pura estéril, para completar o volume final.

A amplificação foi realizada num termociclador “Px2 Thermal Cycler” (Thermo). Depois de uma desnaturação inicial de cinco minutos a 95°C, seguiram-se 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a uma temperatura de ligação que variou segundo os vários marcadores (Quadro 4.1), um minuto a 72°C e uma extensão final de dez minutos a 72°C.

Quadro 4.2. Temperaturas de ligação das sequências iniciadoras.

Marcador	Temperatura de ligação das sequências iniciadoras (°C)
Lm2	53
Lm4	54
B	50
C	50
E	52
F	52
G	54
O	50
P	50
Q	50
R	50
kLIST7031	58
kLIST7039	58

Os fragmentos amplificados foram visualizados, por electroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE com brometo de etídio incorporado, conforme descrito em 3.2.3.3, utilizando-se paralelamente um marcador de massa molecular de 50 pb (GHealth).

Parte do estudo apresentado neste capítulo foi parcialmente realizado durante o estágio efectuado no “Laboratory of Molecular Parasitology”, Berlim, sob a responsabilidade da Doutora G. Schönián e com a colaboração da Doutora K. Kuhls, em particular a amplificação e análise por electroforese capilar, de 59 amostras do grupo da população portuguesa.

4.2.5 Análise da variação do tamanho dos *loci* de microsatélites

A análise da variação das sequências de DNA dos *loci* de microsatélites foi efectuada por electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), no caso dos fragmentos de

maiores dimensões (superiores a 100 pb) ou gel de agarose “Metaphor[®]” (Cambrex), no caso dos fragmentos menores que 100 pb.

4.2.5.1 Electroforese em gel de poliacrilamida

A técnica de electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) tem a vantagem de ter um elevado poder de resolução, podendo separar moléculas de DNA cujo tamanho difere de 0.1% (ou seja, 1 pb em 1000bp), para além de que o DNA recuperado a partir destes géis é extremamente puro e pode ser utilizado posteriormente para outros fins.

O protocolo de PAGE foi efectuado de acordo com Sambrook *et al.*, (1989). As placas de vidro do sistema de electroforese vertical (Biometra, Göttingen, Alemanha) foram previamente lavadas com água destilada e em seguida com etanol absoluto (96%). Uma das superfícies das placas de vidro foi impregnada de “Sigmacote” (Sigma). Após montagem do sistema de electroforese, preparou-se um volume total de gel de poliacrilamida a 12% com aproximadamente 150 ml, contendo 45 ml de Acrilamida:bis acrilamida (29:1), 15 ml de tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) concentrado 10X, 90 ml de água destilada, 750 µl de Persulfato de amónio (APS) a 10% e 75 µl de Tetrametiletilenodiamina (TEMED). Após 30 a 60 minutos de polimerização colocou-se o gel (350x450x0,4 mm) no sistema de electroforese vertical em tampão TBE 1X. Aplicou-se nos poços 15µl de produto de PCR de cada amostra, previamente diluída (5:1) em tampão de aplicação III 6X [0,25% (p/v) de azul de bromofenol (Sigma), 0,25% (p/v) de xileno-cianol (Sigma) e 30% (p/v) de glicerol (Merck) em água ultra-pura]. Paralelamente às amostras em estudo foram colocadas em poços adjacentes amostras de referência. O número de alelos foi estimado com base nas amostras de referência. Simultaneamente com as amostras aplicou-se 6 a 10 µl de uma solução de marcador de massa molecular de 10 pb previamente diluído [(15% de marcador de massa molecular (Invitrogen, Califórnia, USA), 20% de tampão de aplicação III 6X e 65% de tampão TE]. Aplicou-se uma corrente eléctrica de 500 V durante 10 a 12 horas.

Após a electroforese o gel foi imerso numa tina contendo solução fixadora de ácido nítrico 1% (Merck) durante 12 minutos. Seguidamente lavou-se o gel com água destilada e efectuou-se a coloração com uma solução de nitrato de prata 0,2% (Sigma) durante 20 minutos. Seguiu-se outra lavagem com água destilada, efectuou-se nova incubação com

uma solução reveladora extemporânea de carbonato de sódio 0,28 M (Merck) e formaldeído 0,05% durante 20-25 minutos. Após nova lavagem incubou-se o gel numa solução fixadora de ácido acético 10% (Merck) durante cinco minutos de forma a bloquear a reacção. Em seguida retirou-se o excesso de tampão com papel de filtro 3M (Whatman, Göttingen, Alemanha) e secou-se o gel durante duas horas a 75-80°C utilizando um secador de géis de vácuo (Bio-rad) de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.5.2 Electroforese em gel de agarose Metaphor®

A agarose Metaphor® é uma agarose de elevada resolução com uma temperatura de fusão intermédia (+75°C) capaz de detectar diferenças de dois pares de bases e permitir a obtenção de resultados reprodutíveis e comparáveis (Ochsenreither *et al.*, 2006). Esta agarose permite uma elevada resolução na separação de fragmentos de DNA de 20 a 800 pb.

A preparação de géis de agarose Metaphor® a 4% foi efectuada de acordo com as recomendações do fabricante em tampão TBE 1X, ao qual se adicionou brometo de etídio 0,5 µg/ml. Após polimerização do gel, este foi colocado numa tina de electroforese horizontal contendo tampão TBE 1X. Na aplicação de amostras no gel, utilizou-se 6µl de produto de PCR de cada amostra previamente diluído (5:1) em solução corante de laranja G. Em simultâneo com as amostras, aplicou-se 2µl de um marcador de massa molecular de 10 pares de base previamente diluído no corante laranja G. A electroforese decorreu a 100 volts durante 210 minutos. Após a electroforese, retirou-se o gel da tina, observou-se no transiluminador e a imagem foi registada no sistema UVIDOC.

4.2.5.3 Electroforese capilar automatizada por metodologia fluorescente

Neste processo as sequências iniciadoras “forward” foram previamente marcadas com um fluorocromo fluorescente. Cada amostra foi sujeita a electroforese capilar em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes, juntamente com um padrão interno de massa molecular definido, o “CEQ DNA size standard 400” (Beckman Coulter), num sequenciador automático “CEQ 8000” (Beckman Coulter).

Os sinais de fluorescência, emitidos pelos fragmentos marcados e pelo padrão interno, foram analisados pelo software “CEQ™ 8000 Genetic Analysis System”, de forma a calcular a dimensão dos fragmentos amplificados, por PCR, o que permite a análise dos alelos das amostras estudadas.

4.2.6 Análise bioinformática

As tabelas com os resultados em Excel foram convertidas através do programa “Toolkit- Excel Microsatellite Tools” para posterior análise de multilocus com os vários programas bioinformáticos. As distâncias genéticas foram calculadas com o programa MICROSAT (Minch *et al.*, 1997), usando a medida de distância baseada na proporção de alelos partilhados (Dps) que segue o modelo de mutação de alelos infinitos (“infinite allele model”). Foi construída uma árvore consenso baseada no algoritmo “Neighbor-Joining” (NJ) com os programas NEIGHBOR e CONSENSE do pacote PHYLIP versão 3.6 (Felsenstein, 2004). As matrizes de distância foram calculadas com “bootstrap” de 100 réplicas, de forma a avaliar estatisticamente o nível de consistência da topologia da árvore.

Os dados foram igualmente sujeitos a uma análise descritiva com o programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 1995) para cálculo do número de alelos por *locus*, tamanho dos alelos encontrados e riqueza alélica (R_s , medida do número de alelos encontrados independentemente do tamanho da amostra, o que permite comparar amostras com diferentes tamanhos) por cada *locus* e por população, bem como existência de alelos privados (alelos presentes exclusivamente numa população, normalmente com frequências baixas) nas populações estudadas. Foi igualmente calculada a heterozigotia observada (H_o , heterozigotia média observada) e heterozigotia esperada (H_e , diversidade genética média ou a média teórica da heterozigotia de uma população, em que o cálculo é baseado nas frequências alélicas).

4.3 Resultados

4.3.1 Avaliação da especificidade das sequências iniciadoras dos *loci*

Nesta avaliação utilizou-se um grupo de amostras de DNA de diferentes espécies de *Leishmania* (*L. infantum*, *L. donovani*, *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. major*, *L. guyanensis* e *L. braziliensis*) e outros protozoários (*P. falciparum*, *T. cruzi*, *P. jiroveci* e *Cryptosporidium sp.*).

Após amplificação por PCR, observou-se que os *loci* analisados, à exceção dos *loci* Lm4, C e F, se encontram também no genoma de outras espécies para além de *L. donovani s.l.*, uma vez que se observou amplificação de DNA (Quadro 4.3). No entanto, estes produtos de amplificação foram de tamanho diferente dos amplificados nas amostras de *L. donovani s.l.* Observou-se, igualmente, amplificação com as sequências iniciadoras dos *loci* Lm2 e O em *Pneumocystis carinii* e do locus R em *Plasmodium falciparum*.

Quadro 4.3. Especificidade dos *loci* de microssatélites pela amplificação de DNA de diferentes parasitas.

<i>Locus</i>	Amostras										
	<i>Li</i>	<i>Ld</i>	<i>Le</i>	<i>Lt</i>	<i>Lm</i>	<i>Lg</i>	<i>Lb</i>	<i>Pf</i>	<i>Tc</i>	<i>Pj</i>	<i>Cr</i>
Lm2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Lm4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
F	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
O	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
P	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Q	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
R	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
kLIST7031	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
kLIST7039	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Li, *L. infantum*; *Ld*, *L. donovani*; *Le*, *L. aethiopica*; *Lt*, *L. tropica*; *Lm*, *L. major*; *Lg*, *L. guyanensis*; *Lb*, *L. braziliensis*; *Pf*, *P. falciparum*; *Tc*, *T. cruzi*;

Pc, *P. jiroveci*; *Cr*, *Cryptosporidium* sp.

+, presença de banda de amplificação; -, ausência de amplificação.

4.3.2 Análise dos microssatélites em amostras clínicas

De forma a avaliar a utilização dos marcadores directamente a partir de amostras clínicas, procedeu-se à amplificação de DNA destes loci em diferentes amostras humanas e caninas. Os resultados encontram-se no Quadro 4.4.

Relativamente às amostras clínicas, os *loci* que mostraram uma maior sensibilidade foram B, F, G, Q e kLIST7039, uma vez que se observou o produto de amplificação esperado, em amostras de DNA provenientes de casos de LV e LC humana, bem como de órgãos diferentes de cães infectados sintomáticos e assintomáticos.

Nos *loci* Lm2, E, O, R e kLIST7031 observou-se amplificação inespecífica em amostras de humanos saudáveis, assim como em algumas amostras de cães não infectados.

Quadro 4.4. Amplificação dos loci de microsatélites por PCR em DNA de diferentes amostras clínicas humanas e caninas.

Locus	Amostras de DNA									
	Humanas					Caninas				
	medula óssea (LV)	pele (L.C)	sangue periférico	medula óssea		fígado		fígado		
	sintomáticos	assintomáticos	não infectados	sintomáticos	assintomáticos	não infectados	sintomáticos	assintomáticos	não infectados	
Lm2	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Lm4	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
B	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
C	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
E	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
F	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
G	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
O	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Q	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
R	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
kLIST7031	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
kLIST7039	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+

+, presença de banda de amplificação; -, ausência de amplificação.
LV, leishmaniose visceral; L.C, leishmaniose cutânea.

4.3.3 Análise electroforética dos microssatélites na população estudada

No presente trabalho, foram analisados 13 *loci*, em 60 estirpes humanas, 59 de origem canina, quatro de origem vulpina e cinco do vector, provenientes de Portugal. Na Figura 4.1 podem observar-se produtos de PCR dos *loci* Lm2 e Lm4.

Os produtos da amplificação por PCR foram analisados por PAGE (Figura 4.2) ou por agarose de elevada resolução Metaphor[®] (Figura 4.3).

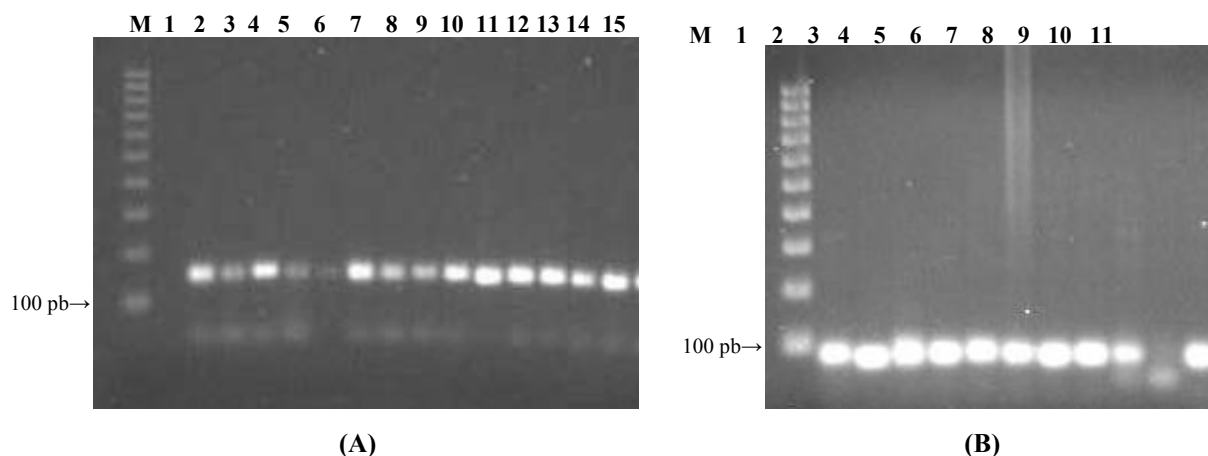
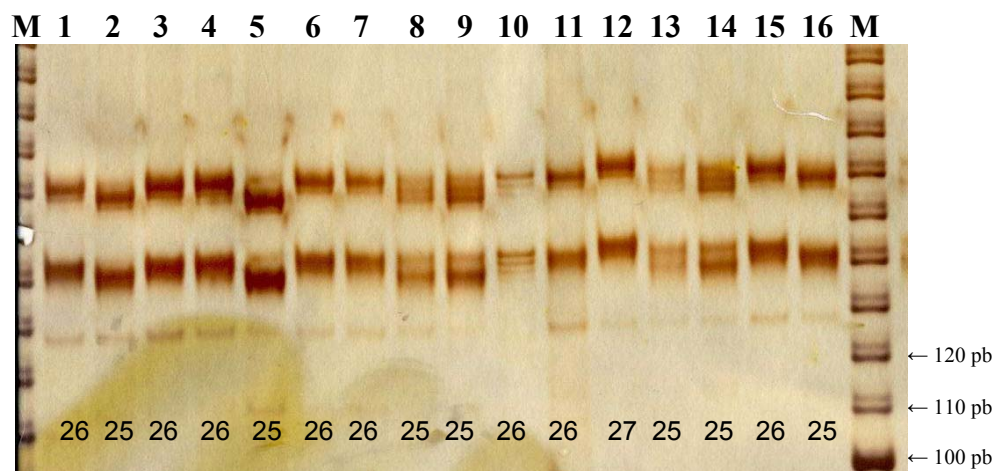
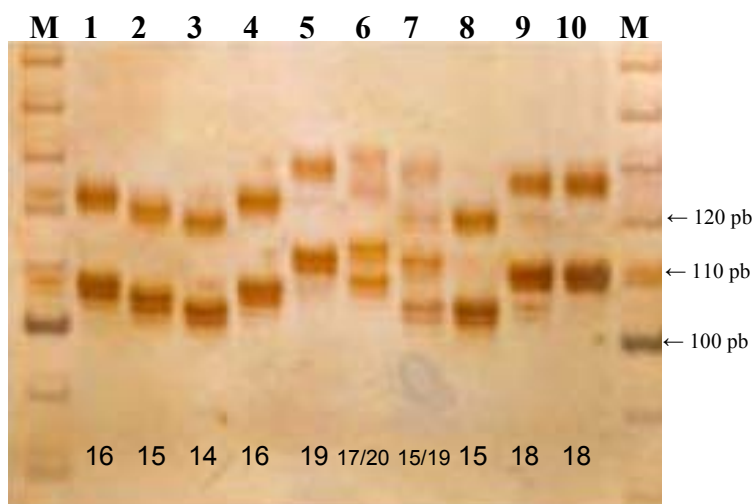


Figura 4.1. Fotografia de um gel de agarose, após electroforese dos produtos de amplificação dos *loci* Lm2 e Lm4. **(A.)** *locus* Lm2: Linhas 1, controlo negativo; Linhas 2 e 3, amostras de referência; Linhas 4 a 15, amostras caninas. **(B.)** *locus* Lm4: Linhas 1,2 e 11, amostras de referência; Linhas 3 a 9 amostras humanas; Linha 10, controlo negativo. M, marcador de massa molecular de 100 pb.



(A)



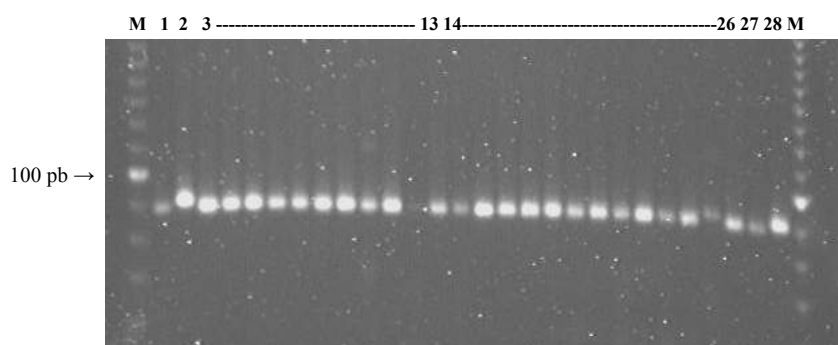
(B)

Figura 4.2. Análise de fragmentos em PAGE 12 % de produtos de PCR amplificados para 2 *locus*.

Na parte superior da figura encontra-se o número das amostras e na parte inferior o número de repetições do dinucleótido.

(A). *locus* Lm2: Linhas 1 e 15, amostra de referência de 26 repetições (BR1); Linhas 2 e 16, amostra de referência de 25 repetições (ESP1); Linhas 3 a 14, amostras caninas.

(B). *locus* G: Linhas 2 e 8, amostras de referência de 15 repetições (ESP1); Linha 6, amostra de referência heterozigótica de 17 e 20 repetições (SD2); Linha 10, amostra de referência de 18 repetições (ET2); Linhas 1, 3 e 4, amostras caninas; Linhas 5 e 9, amostras humanas; Linha 7 amostra de vector. M, marcador de massa molecular de 10 pb.



(A)



(B)

Figura 4.3. Análise dos produtos de PCR em gel de agarose Metaphor®.

(A). *Locus* kLIST7031: Linhas 1 e 27, amostra de referência de 11 repetições dinucleotídicas; Linhas 2 e 28, amostra de referência de 12 repetições nucleotídicas; Linhas 3 a 13, amostras humanas; Linhas 14 a 26, amostras caninas;

(B). *Locus* F: Linhas 1 e 10, amostra de referência de 14 repetições; Linhas 2 e 11, amostra de referência de 16 repetições; Linhas 3 e 12, amostra de referência de 18 repetições; Linhas 4 a 9, amostras humanas portuguesas; Linhas 13 e 14, amostras humanas gregas; Linhas 15 a 17, amostras caninas. M1, massa molecular de 50 pb.

Algumas amostras que apresentaram alelos fora do intervalo do número de repetições das amostras de referência, foram posteriormente enviadas para o “Laboratory of Molecular Parasitology”, Berlim, de forma a serem analisadas por electroforese capilar automatizada com o sequenciador CEQ8000 e o respectivo programa de análise de fragmentos associado ao equipamento. No total dos PCRs efectuados nas 128 amostras portuguesas para os 13 *loci* de microssatélites, observou-se 2,8% de alelos nulos, ou seja, em que não se observou amplificação, tendo estes variado entre zero e oito por *locus*.

4.3.4 Diversidade genética na população estudada de *L. infantum*

Os 13 *loci* analisados revelaram-se polimórficos (Figura 4.4) tendo-se obtido riquezas alélicas (Rs) que variaram de 1,34 a 3,57. Registou-se uma maior Rs nos *loci* Lm2, Lm4, kLIST7031, F e E, traduzindo a existência de maior variação de alelos nestes *loci*.

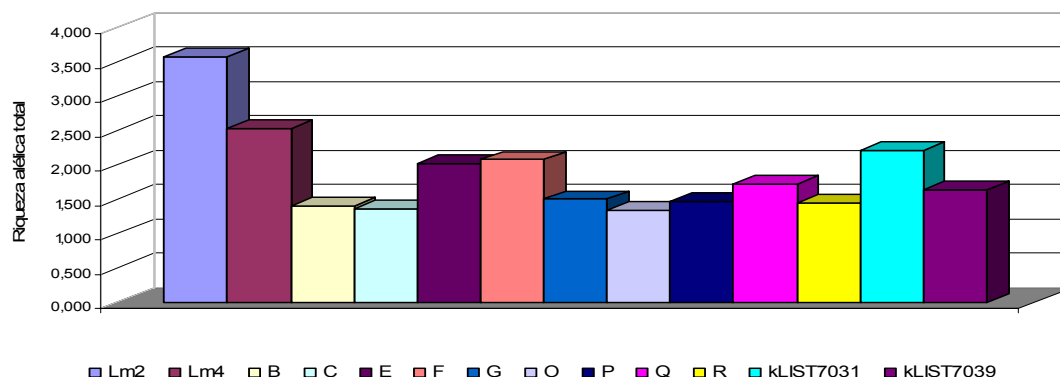


Figura 4.4. Representação gráfica da riqueza alélica dos diferentes *loci* no total de amostras da população portuguesa estudada.

Na análise das amostras de *L. infantum* portuguesas, tendo em conta as identificadas como zimodeme MON-1 (114) e as não-MON-1 (10), onde estão incluídos os dois híbridos *L. infantum/L. major* e as novas variantes enzimáticas, observou-se que, embora o grupo de amostras não-MON-1 fosse muito mais reduzido, o número de alelos encontrados neste grupo foi, superior ao das amostras do grupo MON-1 (Quadro 4.5). O número de alelos das amostras MON-1 variou de 2 a 11 (média de 4,53) e de 2 a 8 (média de 5,46) no grupo de amostras não-MON-1. A heterozigotia observada (H_o) nos diversos *loci* variou entre 0,040 e 0,259, o que indica que todos os *loci* são parcialmente heterozigóticos, enquanto que a heterozigotia esperada, valor indicativo da diversidade genética da população, variou entre 0,317 e 0,779. A maioria dos alelos heretozigóticos foi observada nas amostras do grupo não-MON-1.

Quadro 4.5. Características dos 13 marcadores de microssatélites utilizados para a análise da população de *L. infantum* em Portugal.

Marcador	População ^a	Repetições (menor-maior alelo)	N	Ntotal	Ho	He
Lm2	MON-1	12-28	11	14	0.172	0.779
	não-MON-1	6-26	7			
Lm4	MON-1	4-14	7	8	0.125	0.627
	não-MON-1	4-14	7			
B	MON-1	10-12	2	4	0.191	0.346
	não-MON-1	8-12	4			
C	MON-1	6-10	3	5	0.185	0.337
	não-MON-1	6-9	4			
E	MON-1	12-28	6	11	0.156	0.504
	não-MON-1	5-28	7			
F	MON-1	7-17	5	11	0.152	0.558
	não-MON-1	7-24	9			
G	MON-1	14-22	5	8	0.060	0.422
	não-MON-1	11-22	5			
O	MON-1	9-13	3	5	0.120	0.393
	não-MON-1	9-13	5			
P	MON-1	11-14	3	5	0.109	0.317
	não-MON-1	8-18	3			
Q	MON-1	8-10	3	3	0.040	0.356
	não-MON-1	8-9	2			
R	MON-1	8-14	4	7	0.259	0.365
	não-MON-1	2-13	5			
kLIST 7031	MON-1	10-12	3	5	0.092	0.380
	não-MON-1	10-22	5			
kLIST 7039	MON-1	14-18	4	9	0.139	0.438
	não-MON-1	8-18	8			
Total	MON-1		4.53*		0.139	0.463
	não-MON-1		5.46**			

N, número de alelos encontrados em cada grupo de amostras (MON-1 e não-MON-1); Ntotal, número de alelos encontrados em toda a população estudada; H_o, heterozigotia observada; H_e, heterozigotia esperada

^a, no grupo não-MON-1 estão incluídos 2 híbridos *L. infantum*/*L. major* e as amostras não tipadas

*razão entre a soma do número de alelos encontrados e os loci estudados (59: 13)

**razão entre a soma do número de alelos encontrados e os loci estudados (71: 13)

De entre os vários hospedeiros, humano, canino, raposa e vector, pôde observar-se que as amostras provenientes do vector foram as que apresentaram uma maior Rs, devido à análise de duas estirpes MON-24 isoladas de *Ph. ariasi* do Alto Douro e a uma estirpe MON-1 isolada de *Ph. perniciosus* do Algarve (Figura 4.5).

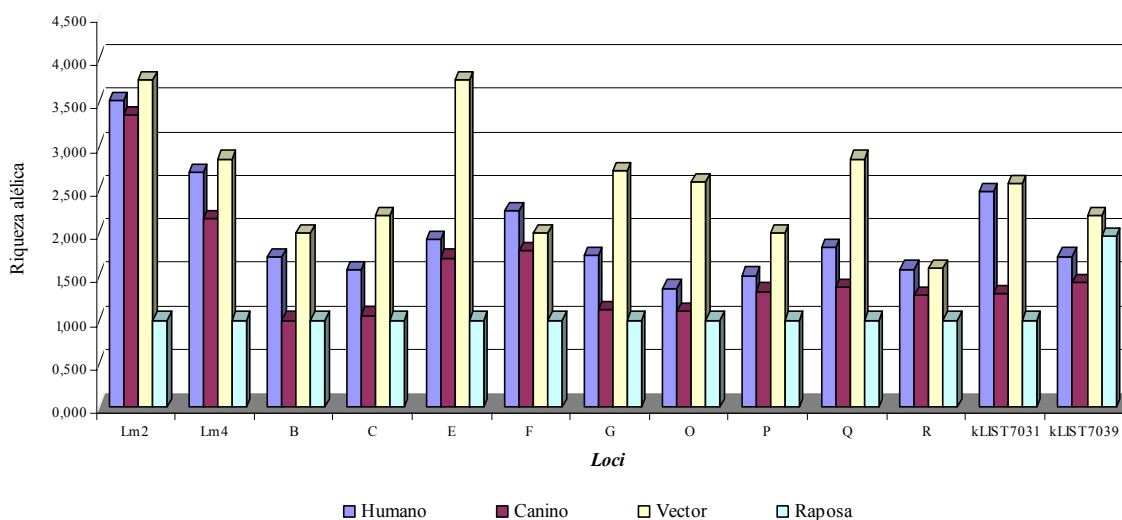


Figura 4.5. Representação gráfica da riqueza alélica dos diferentes *loci* de microsatélites observada nos vários hospedeiros vertebrados e vector.

Foram encontrados seis alelos privados nas amostras de *L. infantum* do vector, nomeadamente Lm2 (28 repetições), C (10 repetições), E (16 repetições), G (19 repetições), O (12 repetições) e P (14 repetições). Comparando as amostras dos hospedeiros humano e canino, observou-se uma maior Rs nas amostras humanas reflectindo uma maior diversidade genética nos parasitas responsáveis pela leishmaniose humana. No grupo das amostras de *L. infantum* provenientes de raposa todos os marcadores foram monomórficos ($R_s=1,00$), com a excepção do *locus* kLIST7039 que resultou numa R_s de 1,96.

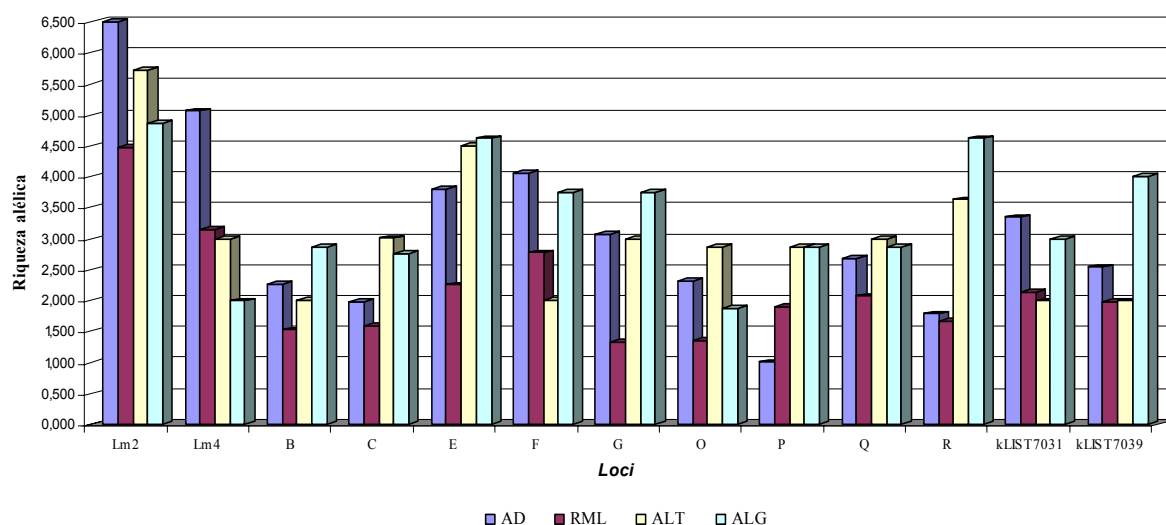


Figura 4.6. Representação gráfica da riqueza alélica na população parasitária das diferentes regiões de Portugal, nos *loci* de microssatélites estudados. AD, Alto Douro; RML, Região Metropolitana de Lisboa; ALT, Alentejo; ALG, Algarve.

Verificou-se uma elevada variação de R_s na população parasitária das diferentes regiões do país (Figura 4.6). Na população do Algarve observou-se uma maior diversidade genética do que na das regiões do Alto Douro e Alentejo, em seis dos 13 *loci* (B, E, F, G, R, kLIST7039). Por outro lado, nestas duas últimas regiões obteve-se uma maior R_s em quatro loci no Alto Douro (Lm2, Lm4, F, kLIST7031) e em três *loci* no Alentejo (C, O, Q). A RML apresentou a menor diversidade genética.

Foi observada elevada heterozigotia nas amostras provenientes das regiões de Alto Douro, Alentejo e Algarve, reflectindo uma maior diversidade genética nestas regiões. É de referir que é nestas regiões que se encontram a maioria das amostras de *L. infantum* do grupo não-MON-1; também nas amostras de *L. infantum* isoladas do vector são do Alto Douro e Algarve.

Em relação às amostras caracterizadas como híbridos de *L. infantum*/*L. major*, encontrou-se numa delas (H7) alelos heterozigóticos em todos os *loci*, com um alelo semelhante ao encontrado na maioria das amostras *L. infantum*, e o outro alelo com tamanho muito diferente, sendo cinco destes alelos privados. Na outra amostra (H40),

observou-se um genótipo com alelos, embora homozigóticos, bastante diferentes dos da maioria das amostras *L. infantum*, e com os mesmos alelos privados da amostra anterior.

Considerando o estado imunitário dos doentes, calculou-se a Rs dos isolados de *L. infantum* provenientes de indivíduos imunocompetentes e imunodeprimidos nos *loci* estudados (Figura 4.7). Observou-se, à exceção de dois *loci* (B e F), Rs superior nas amostras de imunocompetentes do que nas dos imunocomprometidos, reflectindo uma maior variabilidade genética nos primeiros.

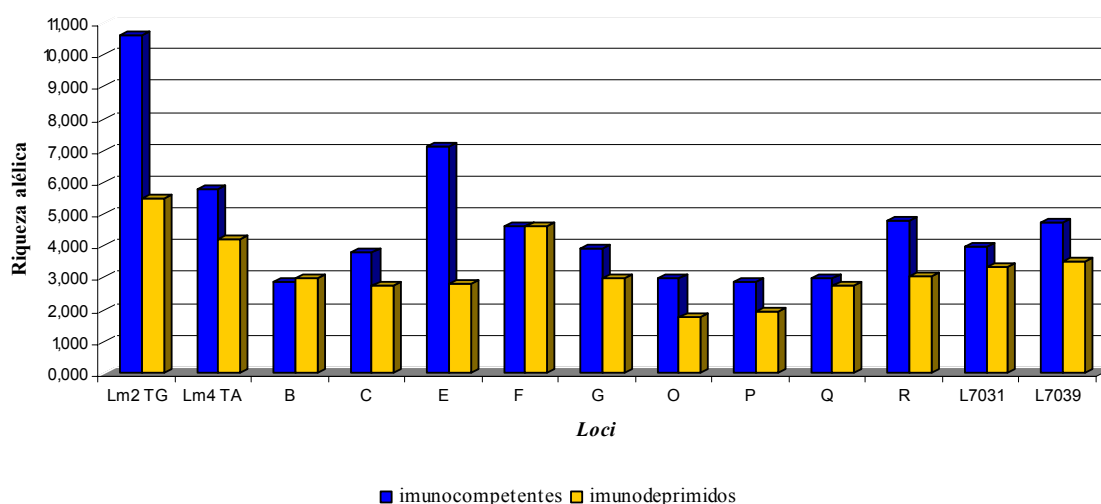


Figura 4.7. Representação gráfica da riqueza alélica dos *loci* de microsatélites estudados nas amostras humanas, tendo em conta o estado imunitário dos doentes (imunocompetentes e imunodeprimidos).

No grupo das amostras humanas encontram-se 17 casos de recidivas relacionadas com 13 doentes imunocomprometidos pela infecção com o VIH. Destes 13 doentes, oito apresentaram genótipos idênticos entre os primeiros e os segundos episódios, sugerindo que os segundos episódios poderão ter sido causados pela mesma estirpe, tratando-se de recaídas. Em três das restantes recidivas, observou-se nos segundos episódios diferenças em quatro ou cinco *loci*, com substituição de um alelo. Num dos restantes casos, em que ocorreram três recidivas (H5, H6 e H7), o primeiro e o segundo episódio originaram genótipos idênticos, enquanto que o terceiro episódio, para além dos alelos dos episódios

anteriores, revelou heterozigotia com um alelo adicional e bastante diferente em todos os *loci*, correspondendo esta à amostra anteriormente referida como híbrida de *L. infantum*/*L. major*.

Efectuou-se a análise conjunta dos alelos obtidos nas amostras da população parasitária portuguesa para os 13 *loci* estudados, nas 27 amostras de referência provenientes de outros países da bacia mediterrânica e do Brasil. Com base na matriz de distância e utilizando o algoritmo “neighbor-joining” foi construído o filograma que se encontra na Figura 4.8, no qual a introdução de uma raiz foi levada a cabo pelo método de “midpoint rooting” (adição de raiz no ponto médio entre as duas unidades taxonómicas operacionais mais distantes). Conforme se observa neste dendrograma, diferenciam-se 85 genótipos, formando dois grupos principais, um constituído por amostras *L. infantum* não-MON-1 e *L. donovani* e outro por *L. infantum* MON-1. Dentro do agrupamento das não-MON-1, pode observar-se um pequeno sub-agrupamento composto pelas amostras provenientes de África Oriental (Sudão e Etiópia) juntamente com uma amostra portuguesa *L. infantum*/*L. major* (H40). Na base do agrupamento formado pelas não-MON-1 encontra-se um pequeno sub-agrupamento constituído pelas amostras gregas que parecem, de algum modo, estar isoladas das restantes. Apesar de duas destas amostras (GR1 e GR5), terem sido identificadas por tipagem isoenzimática como pertencentes ao zimodeme MON-1, apresentaram genótipos considerados não-MON-1.

Os nós que separaram os dois maiores agrupamentos não foram suportados por valores de “bootstrap” significativos. Os valores de “bootstrap” superiores a 70% foram obtidos em nós de sub-agrupamentos.

Não se observou nenhum agrupamento correlacionado com tipo de hospedeiro ou mesmo com a forma clínica da doença, LV ou LC. As amostras provenientes de raposas, representantes do hospedeiro silvático, não mostraram nenhuma posição relevante dentro do agrupamento MON-1. Igualmente, não foi possível estabelecer nas amostras humanas nenhuma correlação entre genótipos e o estado imunitário, imunocompetente ou imunodeprimido. Nas amostras provenientes do vector, observou-se que as duas MON-24 (FL4 e FL5) se posicionaram no agrupamento não-MON-1, como seria de esperar. As restantes amostras FL2 e FL3 (MON-1) mostraram uma posição intermédia no

agrupamento MON-1, ao contrário da amostra FL1, proveniente do Algarve, que apresentou uma elevada heterozigotia (em 10 *loci*) com alelos característicos de amostras MON-1 e não-MON-1, colocando-se na base do dendrograma, perto de uma amostra tipada como uma nova variante enzimática. Em termos de distribuição geográfica, à excepção das amostras de África (três *L. donovani*- SD2, ET1, ET3- e uma *L. infantum*- SD1), não se observou nenhum sub-agrupamento que pudesse evidenciar diferenciação geográfica.

Dentro do agrupamento das estirpes *L. infantum* MON-1 pode observar-se um genótipo que, apesar de não ter suporte de “bootstrap”, contem mais de um terço das amostras Portuguesas. As amostras de *L. infantum* provenientes do Brasil distribuíram-se pelo agrupamento MON-1, não evidenciando qualquer tipo de sub-agrupamento.

Na base da árvore, mas filogeneticamente afastadas dos dois grandes grupos das MON-1, encontra-se um genótipo correspondendo à estirpe híbrida H7 e outro constituído por uma nova variante enzimática (H60). Estas amostras apresentaram alelos predominantemente heterozigóticos, sendo alguns dos alelos idênticos aos das estirpes *L. infantum* MON-1.

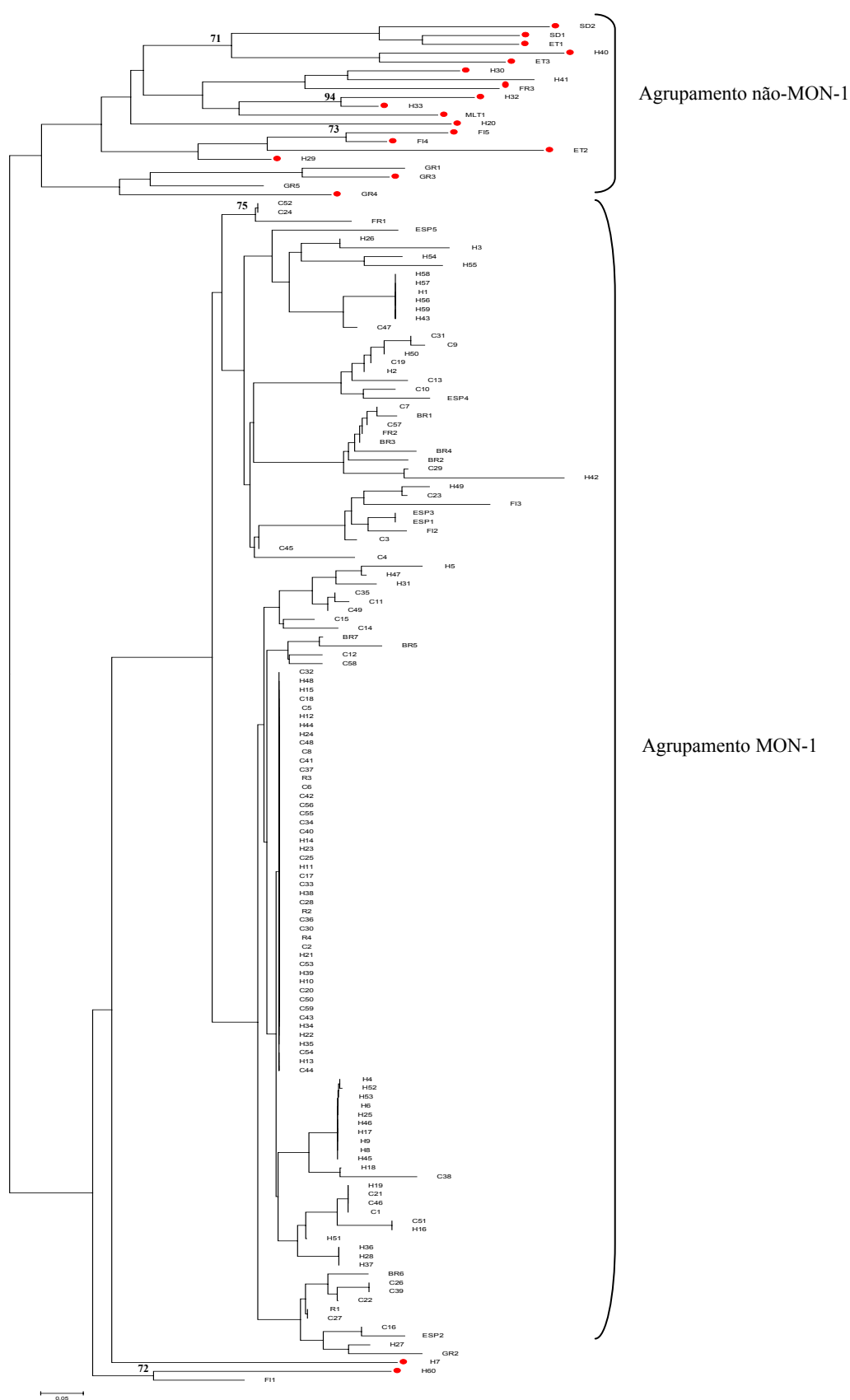


Figura 4.8. Dendrograma “Neighbor-Joining” baseado nas distâncias Dps calculadas a partir dos resultados dos 13 *loci* de 154 amostras de *L. infantum* e *L. donovani* (portuguesas e de referência). H, amostras humanas de Portugal; C, amostras caninas de Portugal; Fl, amostras de flebótomos de Portugal; R, amostras de raposas de Portugal; ESP, amostras de Espanha; FR, amostras de França; GR, amostras da Grécia; MLT, amostra de Malta; SD, amostras do Sudão; ET, amostras da Etiópia; BR, amostras do Brasil; ●, amostras *L. infantum* não-MON-1.

4.4 Discussão

Os microssatélites podem ser encontrados em qualquer genoma e, devido à sua grande variabilidade no número de unidades de repetição em cada *locus*, são uma importante fonte de marcadores moleculares em diferentes áreas da investigação genética (Orti *et al.*, 1997). Desde a década de 90 que se têm publicado trabalhos nos quais se analisam microssatélites potencialmente polimórficos para *Leishmania*, nomeadamente em estirpes do Novo Mundo (Rodriguez *et al.*, 1997; Russell *et al.*, 1999).

Neste estudo foram aplicados 13 marcadores de microssatélites previamente descritos (Ochsenreither *et al.*, 2006; Kuhls *et al.*, 2007) e analisadas 128 amostras portuguesas de diferentes regiões geográficas e formas clínicas da doença, provenientes de diferentes hospedeiros vertebrados e vector, bem como 27 amostras de outras regiões da bacia mediterrânica, África e Brasil. Foi igualmente analisada a especificidade destes marcadores na presença de outras espécies de *Leishmania* e de outros protozoários.

Na análise dos tamanhos dos fragmentos resultantes da amplificação dos *loci*, foram utilizados três métodos, tendo dois deles sido directamente aplicados no nosso laboratório: a análise em PAGE e em gel de agarose Metaphor[®], sendo possível detectar diferenças de dois pares de bases (Ochsenreither *et al.*, 2006). Ambos os métodos se revelaram adequados para a detecção de variações de tamanho dos fragmentos dos diferentes *loci* estudados, apresentando boa resolução. No entanto, em alguns géis, de um modo especial nos géis PAGE, ocorreram bandas inespecíficas, contudo as bandas do tamanho esperado eram as de maior intensidade (de acordo com as amostras de referência). Enquanto que a análise em PAGE se revelou morosa, uma vez que envolveu uma electroforese de cerca de 10 horas com uma série de passos posteriores relativos à coloração com nitrato de prata, a electroforese em gel de agarose Metaphor[®] revelou-se de fácil execução e rápida, embora seja mais apropriada para fragmentos até 100 pares de base. A técnica com estas duas metodologias revelou-se reprodutível e adequada para execução em laboratórios com recursos limitados. A análise electroforética de microssatélites efectuada com gel de agarose Metaphor[®] foi aplicada em outros estudos com diferentes protozoários, nomeadamente *Theileria parva* (Oura *et al.*, 2003). Ochsenreither *et al.* (2006), sugerem

que para a identificação de um grande número de isolados se deve efectuar uma procura inicial de polimorfismos nos diferentes *loci* usando gel de agarose Metaphor® e, posteriormente, determinar o número de repetições de tamanhos diferentes com recurso à análise de fragmentos automatizada, reduzindo assim o número necessário de análises de fragmentos e os custos associados.

No nosso estudo, todos os marcadores se revelaram polimórficos, quer ao nível de espécie *L. infantum*, quer dentro do zimodeme MON-1, revelando um poder discriminativo elevado. Observou-se a amplificação de alguns dos *loci* de microssatélites em várias espécies de *Leishmania* que não *L. donovani* ou *L. infantum*. Este facto foi igualmente observado por outros autores, confirmando que muitos dos marcadores de microssatélites estão presentes em várias espécies, inclusive em espécies consideradas geneticamente afastadas, sendo que, para cada espécie de *Leishmania*, é necessário desenhar um painel de marcadores de microssatélites apropriados para discriminação intra-específica (Schwenkenbecher *et al.*, 2004). Apesar de este conjunto de 13 *loci* de microssatélites se destinar à diferenciação intra-específica, ao nível de estirpes do complexo *L. donovani*, observou-se amplificação para alguns protozoários que não *Leishmania*, nomeadamente de *P. falciparum* e *P. carinii*, que revelaram amplificação nos marcadores R e O, respectivamente. No entanto, a finalidade destes microssatélites é essencialmente para estudos de epidemiologia molecular e genética de populações, não requerendo a especificidade de um marcador molecular destinado ao diagnóstico. Em estudos de tipagem molecular, um outro facto a ter em conta é o número de marcadores microssatélites estudado, uma vez que os resultados são influenciados pelo número de *loci* testados. Quando um número reduzido de *loci* é analisado, as diferenças estimadas entre os isolados estão mais dependentes do tipo de marcadores seleccionados do que do número (Koskinen *et al.*, 2004). Por outro lado, as distâncias genéticas entre isolados distantes são subestimadas na análise de microssatélites quanto maior for o grau de polimorfismo dos marcadores utilizados. No presente trabalho, verificou-se que a análise baseada nas distâncias genéticas revelou valores de “bootstrap” superiores a 70% apenas entre algumas estirpes ou entre pequenos sub-agrupamentos dentro dos grupos principais, e nunca nos nós basais que discriminam os grandes agrupamentos. Este facto está de acordo com a

observação de que os resultados da análise de microssatélites se tornam menos informativos para *taxa* muito distanciados. Daí ser útil a utilização conjunta de marcadores com um menor poder discriminatório (Ochsenreither *et al.*, 2006).

O facto de se efectuar a análise de microssatélites directamente a partir de amostras biológicas, quer humanas quer caninas, poderá ser um factor limitante, uma vez que se observaram produtos de amplificação em tecidos não infectados de dadores voluntários humanos e de cães saudáveis, nomeadamente em cinco dos *loci* (Lm2, E, O, R e kLIST7031). Ao contrário do que é sugerido por Kuhls *et al.* (2007), não se recomendaria a utilização directa de amostras biológicas na tipagem com este conjunto de microssatélites, sendo mais seguro a utilização de DNA de parasitas em culturas. Segundo Kuhls (comunicação pessoal) o facto de cães, ou mesmo humanos, residentes em zonas endémicas apresentarem produtos de amplificação em alguns dos marcadores, sugere que em algum momento estes tenham contacto com o parasita. O grupo da Doutora G. Schönián testou estes marcadores em amostras biológicas provenientes de cães saudáveis residentes em Berlim, região não endémica, não tendo observado qualquer amplificação de DNA (dados não publicados). Os nossos resultados indicam que terá que ser ponderada a utilização directamente a partir de amostras biológicas.

A heterozigotia tem sido relatada com alguma frequência em estudos de microssatélites em tripanossomatídeos (Rossi *et al.*, 1994; Schwenkenbecher *et al.*, 2004; Ochsenreither *et al.*, 2006). A ocorrência de bandas duplas que variam no número de repetições do microssatélite, pode ser explicada tanto pela ocorrência de heterozigotia em *loci* individuais como pela possibilidade do *locus* analisado fazer parte de uma sequência isogénica (Victoir e Dujardin, 2002). Por outro lado, como as estirpes analisadas não foram clonadas, não se pode descartar a hipótese de mistura de populações. Neste estudo a heterozigotia observada nos diversos *loci* variou entre 0,040 e 0,259, o que indica que todos os *loci* foram parcialmente heterozigóticos, tendo o grupo de amostras de *L. infantum* não-MON-1 revelado um número superior de alelos heterozigóticos comparativamente ao grupo de amostras MON-1. No entanto, esta heterozigotia observada ou mesmo a variação ao nível dos diferentes *loci*, poderá estar a ser um pouco subestimada, devido a eventos mutacionais que não reflectem variação de tamanho ou à existência de alelos nulos (Orti *et*

al., 1997), que neste trabalho foi de 2,8% nas amostras portuguesas para a totalidade dos *loci* analisados. Nas estirpes em que se observaram genótipos mistos, quer no grupo MON-1 quer no não-MON-1, poderá haver duas explicações possíveis: tratava-se de infecções mistas ou de estirpes híbridas devido a recombinação genética. Diversas estirpes híbridas têm sido descritas na literatura, em populações naturais (Dujardin *et al.*, 1995; Nolder *et al.*, 2007, Ravel *et al.*, 2006). Na análise de microsatélites das duas amostras identificadas anteriormente como híbridas entre *L. infantum* e *L. major*, verificou-se que estas apresentaram alelos atípicos, nomeadamente uma amostra (H7) com *loci* heterozigóticos em que uns alelos se mostraram semelhante às estirpes MON-1 e os outros bastante diferentes, e outra amostra (H40) com *loci* homozigóticos mas com alelos atípicos relativamente às amostras *L. infantum* MON-1, corroborando a hipótese de recombinação entre estirpes. Verificamos posteriormente que com a amplificação da sequência de ITS1 e posterior restrição enzimática destas amostras, se observaram dois produtos de amplificação e de restrição característicos de cada uma das espécies, *L. infantum* e *L. major*, sugerindo a presença de DNA genómico das duas espécies (Nunes, 2007). Recentemente Maurício *et al.* (2006) ao analisarem por MLST estirpes do complexo *L. donovani*, verificaram a existência de diversos alelos heterozigóticos em *loci* únicos dos genes das enzimas sequenciadas, bem como genomas mosaico, que poderão apontar para a existência de acontecimentos de recombinação mais frequentes do que se considera presentemente (Tibayrenc & Ayala, 2002). Algumas estirpes humanas, uma estirpe canina e três das cinco estirpes provenientes do vector mostraram alelos encontrados nas populações MON-1 e não-MON-1 para quase todos os *loci*. Estes resultados poderão sugerir mecanismos de recombinação genética maioritariamente no flebótomo, salientando o papel que os vectores poderão ter na sustentação da diversidade genética (Volf *et al.*, 2007).

No nosso estudo não se observaram quaisquer relações entre os genótipos obtidos e o hospedeiro ou reservatório. Verificou-se, no entanto, que as amostras humanas revelaram uma maior riqueza alélica que as amostras caninas, ou seja, apesar de se observar diversidade nos dois grupos, esta parece ser superior no primeiro. Este facto parece estar em concordância com a maior parte dos trabalhos com resultados de tipagem isoenzimática, em que o zimodeme predominantemente encontrado em cães é o zimodeme MON-1

(Chicharro *et al.*, 2003; Campino *et al.*, 2006). No nosso grupo de amostras caninas todas pertenciam ao zimodeme MON-1. No grupo MON-1 foram identificados genótipos iguais em amostras caninas e humanas (de imunocompetentes e imunodeprimidos), apontando para uma transmissão entre humanos e cães. Por outro lado, foi possível confirmar o ciclo de transmissão completo, uma vez que se detectaram genótipos muito semelhantes entre isolados humanos, isolados do reservatório canino e do vector provenientes da região do Alto Douro. Este ciclo de transmissão também foi demonstrado noutros estudos, nomeadamente com tipagem isoenzimática e utilizando PCR-RFLP e kDNA como marcador (Chicharro *et al.*, 2002; Campino *et al.*, 2006). Também nas amostras humanas se observou que, os isolados provenientes de doentes imunocompetentes mostraram uma maior variabilidade genética do que os provenientes de doentes imunodeprimidos, contrariando o que se verificou na tipagem isoenzimática, em que a maioria dos zimodemes diferentes de MON-1 foram isolados em doentes co-infectados com VIH-SIDA (Chicharro *et al.*, 2003; Campino *et al.*, 2006).

Em Portugal não foram observados sub-agrupamentos que se pudessem correlacionar com focos endémicos distintos estando de acordo com os resultados por nós obtidos com PCR-RFLP-kDNA, em que também não se observou qualquer associação (Cortes *et al.*, 2006). Igualmente, os estudos efectuados em Portugal por tipagem isoenzimática, mostraram um reduzido polimorfismo enzimático nas estirpes isoladas nos diferentes focos endémicos do país, em que mais de 96% dos isolados pertencem ao zimodeme MON-1 (Campino *et al.*, 2006). Na árvore filogenética pôde observar-se que as amostras provenientes de África formam um pequeno sub-agrupamento, resultante da presença de alguns alelos únicos e alelos heterozigóticos para alguns *loci*. Estes resultados vêm ao encontro do observado por outros autores que utilizaram diferentes marcadores moleculares e que concluíram que estirpes de África e Sudão formam um agrupamento único onde se incluem estirpes *L. donovani*, *L. infantum* e *L. archibaldi*, sendo esta última entidade considerada como pertencente ao complexo *L. donovani*, e não uma taxa separada como defendido por Pratlong *et al.* (2001). As estirpes gregas, parecem apresentar características particulares, dentro dos genótipos não-MON-1, nomeadamente nos *loci* G e Q resultando um alelo de 16 e 10 repetições, respectivamente, colocando-as, à excepção da

estirpe GR4, todas no mesmo agrupamento, independentemente de serem *L. infantum* MON-1 ou MON-98.

A utilização dos microssatélites como ferramenta para o estudo da epidemiologia molecular em diferentes espécies de *Leishmania*, tem-se revelado promissora e neste trabalho mostrou-se que, utilizando um painel de 13 *loci* de microssatélites, é possível observar-se variação intra-específica e, inclusivamente, dentro do zimodeme predominantemente encontrado em Portugal, o zimodeme MON-1.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO

5. Discussão geral e Conclusão

Segundo Schönian *et al.* (2008), a epidemiologia das leishmanioses está a evoluir rapidamente tanto na região mediterrânica como em outras regiões do Mundo, essencialmente devido a três grandes factores: alterações ambientais, sistema imunitário dos hospedeiros e falhas terapêuticas. Daí a importância de se unirem esforços e de se fazerem estudos, nomeadamente ao nível da aplicação das técnicas moleculares de forma a complementarem os convencionais inquéritos epidemiológicos.

Efectuou-se um inquérito de leishmaniose canina num total de 374 cães da Região Metropolitana de Lisboa, em que foi possível, a partir de 72 cães infectados, isolar 49 estirpes de *Leishmania*, tipadas como *L. infantum* zimodeme MON-1. As prevalências da Lcan encontradas nos cães com dono (18,4%) e nos cães sem dono ou vadios (21,6%) não foram estatisticamente diferentes, apesar de esperarmos encontrar uma maior prevalência no grupo de cães sem dono, uma vez que estes estão mais expostos à infecção/doença, devido às condições físicas e sanitárias a que estão sujeitos, a uma vida constante ao ar livre com permanente exposição ao vector, má nutrição e falta de cuidados médicos. Estes resultados vêm salientar a importância do papel desempenhado pelos cães vadios na transmissão do parasita *Leishmania*, tal como defendido também por Miró *et al.* (2007).

Aplicou-se a metodologia de PCR-RFLP utilizando como marcador molecular o kDNA na análise de 161 amostras de DNA de *Leishmania*. As sequências iniciadoras cinetoplastideais desenhadas, MC1 e MC2, revelaram-se específicas e bastante sensíveis para o diagnóstico e genotipagem do complexo *L. donovani* em parasitas isolados em cultura ou directamente a partir de amostras biológicas. Verificou-se variação intra-específica quando a sequência de kDNA amplificada foi digerida com um painel de seis endonucleases de restrição tendo-se obtido 16 genótipos diferentes, dos quais 13 foram observados na população parasitária portuguesa estudada.

Com a aplicação desta metodologia tal como com os marcadores microssatélites não se associou qualquer genótipo com as diferentes regiões geográficas no que respeita às diferentes regiões de Portugal, talvez porque o país representa uma pequena área

onde existem fluxos de migração frequentes entre os diferentes focos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos pela tipagem isoenzimática, em que também não foi possível associar um determinado zimodeme a uma região geográfica ou foco endémico (Campino *et al.*, 2006). Pelo contrário, foi possível estabelecer a associação de um genótipo com uma área geográfica nas amostras provenientes de África (Etiópia e Sudão), que se colocaram todas no mesmo genótipo. Com base no dendrograma obtido com os resultados de kDNA-RFLP, diferenciou-se o grupo I que contém apenas amostras isoladas em Portugal (à excepção de uma brasileira) que poderão ter tido uma evolução recente no nosso país, e o grupo II onde se encontram os genótipos constituídos por estirpes predominantemente não MON-1, nomeadamente *L. infantum* MON-24, MON-78, MON-98, MON-81 e *L. donovani* MON-18, MON-30, MON-31 e MON-82. A estirpe MON-24, proveniente de um doente imunodeprimido português, aparece aqui num grupo bastante distanciado das restantes estirpes. Estes resultados, vêm ao encontro de outros estudos que identificaram estirpes MON-24 em dois grupos separados, um junto a estirpes *L. donovani* e *L. infantum* do Norte de África, e outro junto a estirpes predominantemente MON-1 (Guerbouj *et al.*, 2001; Haralambous *et al.*, 2007).

Aplicou-se a análise de 13 *loci* de microssatélites, descritos como polimórficos para *L. infantum* MON-1, em 154 amostras estudadas por kDNA-RFLP, das quais 128 eram provenientes de diferentes regiões geográficas de Portugal e de diferentes hospedeiros e vectores. A metodologia aplicada para visualização dos resultados (análise por PAGE e agarose Metaphor[®]) revelou-se apropriada no estudo desenvolvido e uma alternativa mais económica à sequenciação directa das amostras ou análise automatizada de fragmentos. Os *loci* estudados revelaram-se bastante polimórficos com 85 genótipos distintos. Observou-se uma maior diversidade no vector e no hospedeiro humano, em oposição ao hospedeiro canino e vulpino, tal como a tipagem isoenzimática e o kDNA-PCR-RFLP também revelaram ser este grupo de isolados menos heterogéneo (Chicharro *et al.*, 2003; Campino *et al.*, 2006). As regiões do Algarve, Alentejo e Alto Douro revelaram, tal como na análise do kDNA-PCR-RFLP, maior diversidade genética dos parasitas do que as outras regiões.

As ferramentas moleculares têm-se revelado bastante úteis para o diagnóstico de LV e caracterização de estirpes de doentes co-infectados com o VIH, uma vez que só

cerca de 40% deles desenvolvem resposta imune humoral ao parasita, limitando o diagnóstico por metodologias serológicas (Medrano *et al.*, 1997). Apesar de se observar uma maior diversidade de zimodemes nos doentes imunodeprimidos, co-infectados com o VIH, em Espanha cerca de 50% pertencem ao zimodeme MON-1 (Chicharro *et al.*, 2003) e em Portugal ultrapassa os 90% (Campino *et al.*, 2006). No nosso estudo, com ambos os marcadores moleculares, verificámos uma maior diversidade genética no grupo dos imunocompetentes do que nos imunodeprimidos. Através da análise do kDNA e dos microssatélites, observou-se que no caso de recidivas nos doentes imunodeprimidos, puderam observar-se diferenças entre genótipos relativamente aos primeiros e subsequentes episódios, que poderão permitir a diferenciação entre recaídas e re-infecções, tal como Morales *et al.* (2002) verificaram. Na análise dos genótipos resultantes do kDNA-RFLP verificou-se a associação entre o genótipo A e os doentes imunodeprimidos e o genótipo B e os doentes imunocompetentes. Apesar de se ter observado a predominância destes dois genótipos, o genótipo A, que ocorreu em maior percentagem, foi exclusivamente encontrado no nosso país. Na análise dos microssatélites não se observou associação entre os alelos dos *loci* analisados e os doentes imunocompetentes ou imunocomprometidos.

Relativamente à análise de microssatélites de 2 amostras de DNA obtidas a partir de estirpes híbridas entre *L. major* e *L. infantum*, verificou-se que estas apresentaram alelos atípicos, nomeadamente uma amostra com *loci* heterozigóticos em que um dos alelos se mostrou semelhante às estirpes MON-1 e o outro bastante diferente. Na análise por kDNA-RFLP, esta amostra não revelou qualquer divergência em termos de genótipos, tendo apresentado um dos genótipos mais frequentes (B), o que nos leva a pensar que esta estirpe teria um genoma *L. infantum* dominante. Estes resultados vêm uma vez mais levantar questões relativamente à frequência da recombinação em *Leishmania*, uma vez que a sua propagação é essencialmente clonal (Tibayrenc *et al.*, 1990). A hibridação de estirpes de *Leishmania* evidenciam trocas genéticas, apesar da ausência de um estadio sexuado. Existem, contudo, raras evidências, obtidas *in vitro*, da possível reprodução sexual que parece tomar lugar na forma amastigota (Kreutzer *et al.*, 1994; Youssef *et al.*, 1997).

Do ponto de vista epidemiológico a ocorrência de trocas genéticas entre *L. infantum* e *L. major* revela-se um acontecimento muito raro, pois a distribuição

geográfica de estas duas entidades não é, aparentemente, sobreponível uma vez que *L. infantum* se distribui pela bacia mediterrânica e *L. major* encontra-se predominantemente em regiões áridas da Ásia e África. De igual modo, os reservatórios e vectores destas duas espécies também diferem, sendo *L. infantum* transmitida essencialmente por canídeos através dos vectores do subgénero *Larrousius*, nomeadamente *Ph. ariasi* e *Ph. perniciosus*, enquanto que *L. major* é transmitida por roedores através dos vectores do subgénero *Phlebotomus* (*Ph. papatasi* e *Ph. duboscqi*) (Ravel *et al.*, 2006).

Volf *et al.* (2007) verificaram que a eficácia comportamental da estirpe (H7) híbrida de *L. infantum*/*L. major* era superior quando comparada com *L. infantum*, aumentando o potencial de transmissão e a capacidade de sobrevivência num vector específico, como é o caso de *Ph. papatasi*. Este facto poderá ter implicações epidemiológicas importantes, uma vez que este vector se encontra amplamente distribuído pela Europa, África e Ásia, podendo estas estirpes híbridas circular através do insecto vector e ocorrer dispersão para novos focos. No entanto, o comportamento trófico, mobilidade limitada e reduzido tempo de vida deste flebotomíneo, tornam esta hipótese, a confirmar-se, num acontecimento raro. Estas trocas genéticas entre populações naturais de *Leishmania* poderão ter implicações médicas importantes nomeadamente na transmissão de resistência a fármacos e alterações na patogenicidade dos agentes infecciosos (Ravel *et al.*, 2006).

O facto de se ter conseguido individualizar as estirpes europeias das da Etiópia e Sudão, quer nos resultados obtidos no kDNA-PCR-RFLP quer na análise por microssatélites, vêm corroborar outros estudos que agrupam as estirpes de África Oriental num grupo diferenciado (Botilde *et al.*, 2006; Lukes *et al.*, 2007; Maurício *et al.*, 2007; Kuhls *et al.*, em publicação). No nosso estudo, tal como observado por Lukes *et al.* (2007), a individualização do sub-agrupamento das estirpes de África, parece estabelecer-se de acordo com origem geográfica incluindo estirpes anteriormente consideradas como diferentes espécies, ou seja, *L. infantum*, *L. donovani* e *L. archibaldi*, evidenciando divergência genética das *L. infantum* europeias. Ao nível intra- e inter-específico, a avaliação da diversidade genética é a base para todos os estudos de taxonomia e genética de populações e, consequentemente para a compreensão da evolução dos organismos. No nosso estudo, quer pela análise de kDNA-PCR-RFLP

quer pela análise de microssatélites multilocus, foi igualmente detectada a presença de amostras geneticamente muito similares, com grande distância geográfica, entre Portugal e Brasil, permitindo-nos suportar a teoria de que *L. chagasi* e *L. infantum* são a mesma espécie.

Os resultados obtidos com os dois marcadores moleculares revelaram-se bastante discriminatórios, permitindo evidenciar uma elevada diversidade genética, apesar de os marcadores microssatélites terem revelado uma maior diversidade que o kDNA. Num estudo recente de tipagem molecular efectuado por Botilde *et al.* (2006), em 25 estirpes de *L. infantum* e *L. donovani* da bacia mediterrânica, a aplicação de PCR-RFLP-kDNA, PCR-RFLP-proteinase cisteína beta ou tipagem de microssatélites multilocus revelou um maior poder discriminatório do que a análise por RAPD ou por tipagem isoenzimática. Os resultados do nosso estudo mostraram que Portugal, até ao presente considerado um país “homogéneo” no que respeita às espécies e zimodemes de *Leishmania* (Campino *et al.*, 2006), apresenta maior diversidade genética do que tem sido considerado. No inquérito canino por nós realizado, todas as estirpes foram tipadas como *L. infantum* MON-1. Assim a técnica de MLEE, revela-se limitada quanto à detecção de variação genotípica das estirpes, não sendo, por isso, adequada a estudos de microepidemiologia (Lewin *et al.*, 2002).

No entanto, são necessários estudos mais alargados relacionados com a diversidade de *L. infantum*, e a utilização de outros marcadores moleculares, por forma a obter conclusões mais firmes no que respeita à epidemiologia da leishmaniose em Portugal.

Em conclusão, os resultados por nós obtidos tal como outros estudos, em que se analisaram marcadores moleculares com diferentes graus de discriminação, demonstraram que uma identificação e diferenciação das diferentes espécies e estirpes dos parasitas do género *Leishmania* é conseguida com uma maior precisão através da sua caracterização molecular. No estudo apresentado nesta tese, a análise molecular revestiu-se de grande importância, na medida em que permitiu perceber que a diversidade dos parasitas *Leishmania* no nosso país é maior do que se tem considerado até ao presente. Possibilitou igualmente o conhecimento da existência de genótipos exclusivos em Portugal, possivelmente, de evolução recente no país. A variabilidade

genética no hospedeiro humano e no vector que foi superior à dos canídeos sugerindo a potencial existência de outro reservatório.

Todavia, é importante realçar que estas conclusões assentam nos resultados actualmente existentes e, em particular, dos obtidos no presente trabalho. No futuro, a caracterização de um número de parasitas mais vasto e aplicação de outros alvos moleculares, poderá originar resultados complementares aos actuais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências bibliográficas

Abranches, P., Pires, C.A. (1980). O kala-azar em Portugal. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 3: 203-217.

Abranches, P., Conceicao Silva, F.M., Ribeiro, M.M., Lopes, F.J., Gomes, L.T. (1983). Kala-azar in Portugal--IV. The wild reservoir: the isolation of a *Leishmania* from a fox. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 420-421.

Abranches, P. (1984). O Kala-azar da área metropolitana de Lisboa e da região de Alcácer do Sal. Estudos sobre os reservatórios doméstico e silvático e sobre a população humana em risco de infecção. *Tese Doutoramento*. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, pp.226.

Abranches, P., Pires, C.A., Conceição-Silva, F.M., Silva-Pereira, M.C.D., Gomes, G.M.S. (1987). Kala-azar em Portugal VI. Inquérito epidemiológico realizado na região metropolitana de Lisboa interpretação da estrutura e dinâmica do foco endêmico. *Jornal das Ciências Médicas de Lisboa*, 151: 364-379.

Abranches, P., Sampaio-Silva, M.L., Santos-Gomes, G.M., Avelino, I.C., Pires, C.A., Conceição-Silva, F.M., Seixas-Lopes, A., Silva-Pereira, M.C.D., Janz, J.G. (1992). Kala-azar in Portugal.VII. Epidemiological survey in Alijó (endemic region of Alto Douro). *Research and Reviews in Parasitology*, 52: 121-124.

Afonso, M.O., Campino, L., Cortes, S., Alves-Pires, C. (2005). The phlebotomine sandflies of Portugal. XIII--Occurrence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 in the Arrabida leishmaniasis focus. *Parasite*, 12: 69-72.

Alvar, J., Ballesteros, J.A., Soler, R., Benito, A., Van Eys, G.J., Schoone, G.J., Cabrer, B. (1990). Mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*: biochemical characterization. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 43: 614-618.

Alvar, J., Jimenez, M. (1994). Could infected drug-users be potential *Leishmania infantum* reservoirs? *Aids*, 8: 854.

Alvar, J., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Jimenez, M., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Molina, R., Moreno, J. (1997). *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, 10: 298-319.

Alvar, J., Yactayo, S., Bern, C. (2006). Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology*, 22: 552-7.

Alvares, D. (1910). Um caso de kala-azar infantil em Lisboa. *Medicina Contemporânea*, 13: 90-97.

Alves-Pires, C. (2000). Os flebótomos (Diptera, Psychodidae) dos focos zoonóticos de leishmanioses em Portugal. *Tese Doutorado*. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, pp.205.

Alves-Pires, C., Campino, L., Afonso, M.O., Santos-Gomes, G., Dedet, J.P., Pratlong, F. (2001). Les Phlébotomes du Portugal. X. Infestation naturelle de *Phlebotomus perniciosus* par *Leishmania infantum* MON-1 en Algarve. *Parasite*, 8: 374-375.

Anders, G. (2003). PCR Diagnosis of Leishmaniasis in Israel and the West Bank. *Tese Doutorado*. Universität zu Berlin, Berlin, pp.130.

Andresen, K., Gasim, S., El-Hassan, A.M., Khalil, E., Barker, D.C., Theander, T.G., Kharazmi, A. (1997). Diagnosis of visceral leishmaniasis by the polymerase chain reaction using blood, bone marrow and lymph node samples from patients from the Sudan. *Tropical Medicine & International Health*, 2: 440-444.

Angelici, M.C., Gramiccia, M., Gradoni, L. (1989). Study on genetic polymorphism of *Leishmania infantum* through the analysis of restriction enzyme digestion patterns of kinetoplast DNA. *Parasitology*, 99: 301-309.

Aoun, K., Bouratbine, A., Harrat, Z., Guizani, I., Mokni, M., Bel Hadj Ali, S., Ben Osman, A., Belkaid, M., Dellagi, K., Ben Ismail, R. (2000). Epidemiologic and parasitologic data concerning sporadic cutaneous leishmaniasis in northern Tunisia. *Bulletin de la Société de Pathologies Exotiques*, 93: 101-3.

Asford, R.W., Bettini, S. (1987). Ecology and Epidemiology: Old World. In *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, W. Peters, Killick-Kendrick, R. (Ed.), Academic Press, New York, London, pp. 365-424.

Ashford, R.W. (1988). Numbers of sandflies infected with *Leishmania*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82: 655-6.

Ashford, D.A., Bozza, M., Freire, M., Miranda, J.C., Sherlock, I., Eulalio, C., Lopes, U., Fernandes, O., Degraeve, W., Barker Jr., R.H., Badaró, R., David, J.R. (1995). Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53: 251-255.

Attar, Z.J., Chance, M.L., el-Safi, S., Carney, J., Azazy, A., El-Hadi, M., Dourado, C., Hommel, M. (2001). Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Tropica*, 78: 11-6.

Azevedo, J.F. (1960). Sobre o diagnóstico do kala-azar. *Jornal do Médico*, 43: 265-272.

- Badaro, R., Benson, D., Eulalio, M.C., Freire, M., Cunha, S., Netto, E.M., Pedral-Sampaio, D., Madureira, C., Burns, J.M., Houghton, R.L., David, J.R., Reed, S.G.** (1996). rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 173: 758-61.
- Banuls, A.L., Guerrini, F., Le Pont, F., Barrera, C., Espinel, I., Guderian, R., Echeverria, R., Tibayrenc, M.** (1997). Evidence for hybridization by multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA between *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis/guyanensis* in Ecuador. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44: 408-11.
- Banuls, A.L., Hide, M., Prugnolle, F.** (2007). *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*, 64: 1-109.
- Barker, D.C.** (1987). DNA diagnosis of human leishmaniasis. *Parasitology Today*, 3: 177-184.
- Barker, D.C.** (1989). Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology*, 99 Suppl: S125-46.
- Belhadj, S., Pratlong, F., Hammami, M., Kallel, K., Dedet, J.P., Chaker, E.** (2003). Human cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in the Sidi Bourouis focus (Northern Tunisia): epidemiological study and isoenzymatic characterization of the parasites. *Acta Tropica*, 85: 83-6.
- Belli, A.A., Miles, M.A., Kelly, J.M.** (1994). A putative *Leishmania panamensis/Leishmania braziliensis* hybrid is a causative agent of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Parasitology*, 109: 435-42.
- Benikhlef, R., Pratlong, F., Harrat, Z., Seridi, N., Bendali-Braham, S., Belkaid, M., Dedet, J.P.** (2001). [Infantile visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* zymodeme MON-24 in Algeria]. *Bulletin de la Société de Pathologies Exotiques*, 94: 14-6.
- Benne, R.** (1993). RNA editing in mitochondria of *Leishmania tarentolae* and *Crithidia fasciculata*. *Seminars in Cell Biology*, 4: 241-9.
- Berrahal, F., Mary, C., Roze, M., Berenger, K., Escoffier, K., Lamouroux, D., Dunan, S.** (1996). Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55: 273-277.
- Berzunza-Cruz, M., Bricaire, G., Romero, S.Z., Perez-Becker, R., Saavedra-Lira, E., Perez-Montfort, R., Crippa-Rossi, M., Velasco-Castrejon, O., Becker, I.** (2000). *Leishmania mexicana mexicana*: genetic heterogeneity of mexican isolates revealed by

restriction length polymorphism analysis of kinetoplast DNA. *Experimental Parasitology*, 95: 277-84.

Blair, M.W., Hedetale, V., McCouch, S.R. (2002). Fluorescent-labeled microsatellite panels useful for detecting allelic diversity in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and applied genetics*, 105: 449-457.

Boelaert, M., Rijal, S., Regmi, S., Singh, R., Karki, B., Jacquet, D., Chappuis, F., Campino, L., Desjeux, P., Le Ray, D., Koirala, S., Van der Stuyft, P. (2004). A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70: 72-7.

Borst, P. (1991). Why kinetoplast DNA networks? *Trends in Genetics*, 7: 139-41.

Bossolasco, S., Gaiera, G., Olchini, D., Gulletta, M., Martello, L., Bestetti, A., Bossi, L., Germagnoli, L., Lazzarin, A., Uberti-Foppa, C., Cinque, P. (2003). Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 5080-5084.

Botilde, Y., Laurent, T., Quispe Tintaya, W., Chicharro, C., Canavate, C., Cruz, I., Kuhls, K., Schonian, G., Dujardin, J.C. (2006). Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. *Infection, genetics and evolution*, 6: 440-6.

Bozza, M., Fernandes, O., Degraeve, W.M., Lopes, U.G. (1995). Characterization of "Old World" *Leishmania* species using amplified minicircle variable regions as molecular probes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89: 333-334.

Bray, R.S. (1982). The zoonotic potencial of reservoirs of leishmaniasis in the Old World. *Ecology of Disease*, 1: 257-267.

Bryceson, A. (1996). Tropical medicine for the 21st century. Tropical medicine should be concerned with medical problems endemic to the tropics. *British Medical Journal*, 312: 247.

Bulle, B., Millon, L., Bart, J.M., Gallego, M., Gambarelli, F., Portus, M., Schnur, L., Jaffe, C.L., Fernandez-Barredo, S., Alunda, J.M., Piarroux, R. (2002). Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 3391-7.

Calheiros, J.M., Casimiro, E., et al. (2006). Saúde Humana e Implicações para o Turismo. In *Alterações climáticas em Portugal: Cenários, Impactos e Medidas de Adaptação –Projecto SIAM II*, P. M. F.D. Santos (Ed.), Gradiva, Lisboa, pp. 233-270.

Campino, L. (1991). Aplicação de duas técnicas sero-imunológicas: imunofluorescência indirecta (IFI) e contraímuno-electroforese (CIE) no estudo da leishmaniose visceral. *Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica*. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, pp.77.

- Campino, L., Santos-Gomes, G., Pratlong, F., Dedet, J.P., Abranches, P.** (1994a). HIV-*Leishmania* co-infection in Portugal: isolation of *Leishmania infantum* MON-24. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88: 394.
- Campino, L., Santos-Gomes, G., Pratlong, F., Dedet, J.P., Abranches, P.** (1994b). The isolation of *Leishmania donovani* MON-18, from an AIDS patient in Portugal: possible needle transmission. *Parasite*, 1: 391-2.
- Campino, L., Capela, M.J.R., Maurício, I.L., Ozensoy, S., Abranches, P.** (1995). O Kala-Azar em Portugal.IX.A região do Algarve:Inquérito epidemiológico sobre o reservatório canino no concelho de Loulé. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 18: 189-194.
- Campino, L., Santos-Gomes, G.M., Pratlong, F., Antunes, F., Maurício, I., Dedet, J.P., Abranches, P.** (1997). HIV/*Leishmania* co-infections in Portugal: diagnosis and isoenzyme characterization of *Leishmania*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 91: 433-6.
- Campino, L.** (1998). Leishmanioses em Portugal. Características emergentes da epidemiologia e do diagnóstico. *Tese Doutoramento*. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, pp.192.
- Campino, L., Cortes, S., Pires, R., Oskam, L., Abranches, P.** (2000). Detection of *Leishmania* in immunocompromised patients using peripheral blood spots on filter paper and the polymerase chain reaction. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19: 396-8.
- Campino, L.** (2002). Canine reservoirs and leishmaniasis: epidemiology and disease. In *World Class Parasites: Leishmania*, J. P. Ferrel (Ed.), Kluwer Academic Editors, London, pp. 45-57.
- Campino, L., Bajanca, R., Franca, I., Pratlong, F., Dedet, J., Fiadeiro, T.** (2005). Cutaneous leishmaniosis in Portugal due to *Leishmania infantum* MON-1. *Acta Médica Portuguesa*, 18: 475-7.
- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J.A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Cortes, S., Ramada, J., Cristovao, J.M., Afonso, M.O., Dedet, J.P.** (2006). Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine and International Health*, 11: 1708-14.
- Cardoso, L., Santos, H., Cordeiro-da-Silva, A., Pratlong, F., Dedet, J.P., Rodrigues, M.** (2002). *Leishmania infantum* MON-98: infection in a dog from Alto Douro, Portugal. *Acta Tropica*, 83: 83-5.
- Cardoso, L., Rodrigues, M., Santos, H., Schoone, G.J., Carreta, P., Varejao, E., van Benthem, B., Afonso, M.O., Alves-Pires, C., Semiao-Santos, S.J., Rodrigues, J., Schallig, H.D.** (2004). Sero-epidemiological study of canine *Leishmania spp.* infection

in the municipality of Alijo (Alto Douro, Portugal). *Veterinary Parasitology*, 121: 21-32.

Catorze, G., Alberto, J., Afonso, A., Vieira, R., Cortes, S., Campino, L. (2006). *Leishmania infantum*/HIV co-infection: cutaneous lesions following treatment of visceral leishmaniasis. *Annales de Dermatologie et Venereologie*, 133: 39-42.

Chaffai, M., Ben Rachid, M.S., Ben-Ismaïl, R., Ben Osman, A., Makni, N. (1988). Clinico-epidemiologic forms of cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Annales de Dermatologie et Venereologie*, 115: 1255-60.

Chelbi, I., Zhioua, E. (2007). Biology of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *Journal of Medical Entomology*, 44: 597-600.

Chicharro, C., Morales, M.A., Serra, T., Ares, M., Salas, A., Alvar, J. (2002). Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96 Suppl 1: S93-9.

Chicharro, C., Jimenez, M.I., Alvar, J. (2003). Iso-enzymatic variability of *Leishmania infantum* in Spain. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 97 Suppl 1: 57-64.

Constantine, C.C. (2003). Importance and pitfalls of molecular analysis to parasite epidemiology. *Trends in Parasitology*, 19: 346-8.

Cortes, S., Rolão, N., Ramada, J., Campino, L. (2004). PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98: 12-7.

Cortes, S., Maurício, I., Almeida, A., Cristovão, J.M., Pratlong, F., Dedet, J.P., Campino, L. (2006). Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitology International*, 55: 277-83.

Cortes, S., Afonso, M.O., Alves-Pires, C., Campino, L. (2007). Stray Dogs and Leishmaniasis in Urban Areas, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 1431-1432.

Cruz, A.K., Titus, R., Beverley, S.M. (1993). Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 90: 1599-603.

Cruz, I., Morales, M.A., Noguer, I., Rodriguez, A., Alvar, J. (2002). *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet*, 359: 1124-5.

Cruz, I., Nieto, J., Moreno, J., Canavate, C., Desjeux, P., Alvar, J. (2006). *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian Journal of Medical Research*, 123: 357-88.

- Cupolillo, E., Grimaldi Junior, G., Momen, H., Beverley, S.M.** (1995). Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Molecular Biochemical Parasitology*, 73: 145-55.
- Dams, E., Hendriks, L., Van de Peer, Y., Neefs, J.M., Smits, G., Vandenbempt, I., De Wachter, R.** (1988). Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 16 Suppl: r87-173.
- Dantas-Torres, F., de Brito, M.E., Brandao-Filho, S.P.** (2006). Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Veterinary Parasitology*, 140: 54-60.
- Dedet, J.P.** (2002). Current status of epidemiology of Leishmaniases. In *World Class Parasites: Leishmania*, J. P. Farrell (Ed.), Kluwer Academic Publishers, London, pp. 1-10.
- Dedet, J.P., Pratlong, F.** (2003). Leishmaniasis. In *Manson's Tropical Diseases*, G. C. Cook, A. Zumla (Eds.), Saunders, London, pp. 1339-1364.
- Dereure, J., Lanotte, G., Pratlong, F., Gouvernet, J., Majhour, J., Belazzoug, S., Khiami, A., Rageh, H.A., Jarry, D., Perieres, J., Rioux, J.A.** (1998). Canine leishmaniasis from *Leishmania infantum*: value and production of the latex test. Ecoepidemiologic applications. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 91: 300-5.
- Dereure, J., Pratlong, F., Dedet, J.P.** (1999). Geographical distribution and the identification of parasites causing canine leishmaniasis in the Mediterranean Basin. In *Canine leishmaniasis : an update*, Killick-Kendrick (Ed.), Hoechst Roussel Vet, Wiesbaden, pp. 18-25.
- Desjeux, P.** (1992). Human leishmaniases: epidemiology and public health aspects. *World Health Organization Statistics Quarterly*, 45: 267-275.
- Desjeux, P., Alvar, J.** (2003). *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 97 Suppl 1: 3-15.
- Desjeux, P.** (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27: 305-18.
- Develoux, M., Diallo, S., Dieng, Y., Mane, I., Huerre, M., Pratlong, F., Dedet, J.P., Ndiaye, B.** (1996). Diffuse cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* in Senegal. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90: 396-7.
- di Martino, L., Gramiccia, M., Occorsio, P., Di Muccio, T., Scalone, A., Gradoni, L.** (2004). Infantile visceral leishmaniasis in the Campania region, Italy: experience from a Paediatric Referral Centre. *Parassitologia*, 46: 221-223.

- Dujardin, J.C., Banuls, A.L., Llanos-Cuentas, A., Alvarez, E., DeDoncker, S., Jacquet, D., Le Ray, D., Arevalo, J., Tibayrenc, M.** (1995). Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Tropica*, 59: 293-307.
- Dujardin, J.C., Victoir, K., De Doncker, S., Guerbouj, S., Arevalo, J., Le Ray, D.** (2002). Molecular epidemiology and diagnosis of *Leishmania*: what have we learnt from genome structure, dynamics and function? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96 Suppl 1: S81-6.
- Dujardin, J.C., Campino, L., Canavate, C., Dedet, J.P., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazerisg, A., Ozelh, Y., Boelaert, M.** (2007). Global warming and spreading of vector-borne diseases in Europe: the globalisation of neglect? *Lancet*.
- Durand, I., Beylot-Barry, M., Weill, F.X., Doutre, M.S., Beylot, C.** (1998). Disseminated cutaneous leishmaniasis revealing human immunodeficiency virus infection. *Annales de Dermatologie et Vénéréologie*, 125: 268-70.
- El Tai, N.O., El Fari, M., Mauricio, I., Miles, M.A., Oskam, L., El Safi, S.H., Presber, W.H., Schonian, G.** (2001). *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. *Experimental Parasitology*, 97: 35-44.
- Ellegren, H.** (2000). Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics*, 16: 551-558.
- Engvall, E., Perlmann, P.** (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA. III. Quantification of specific antibodies by enzyme labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *The Journal of Immunology*, 109: 129-135.
- Evans, D.A., Kennedy, W.P., Elbihari, S., Chapman, C.J., Smith, V., Peters, W.** (1987). Hybrid formation within the genus *Leishmania*? *Parassitologia*, 29: 165-73.
- Felsenstein, J.** (2004). PHYLIP: Phylogeny Inference Package computer program, version 3.6., Seattle.
- Ferroglio, E., Romano, A., Trisciuglio, A., Poggi, M., Ghiggi, E., Sacchi, P., Biglino, A.** (2006). Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100: 636-41.
- Fisa, R., Gallego, M., Castillejo, S., Aisa, M.J., Serra, T., Riera, C., Carrio, J., Gallego, J., Portus, M.** (1999). Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Veterinary Parasitology*, 83: 87-97.
- Garnham, P.C.C.** (1965). The leishmanias, with special reference to the role of animal reservoirs. *American Zoologist*, 5: 141-151.

- Gothe, R., Nolte, I., Kraft, W.** (1997). Leishmaniasis in dogs in Germany: epidemiological case analysis and alternatives to conventional causal therapy. *Tierärztliche Praxis*, 25: 68-73.
- Goudet, J.** (1995). FSTAT (version 1.2): A computer program to calculate F- statistics. *Journal of Heredity*, 86: 485-486.
- Gradoni, L., Gramiccia, M., Pozio, E.** (1984). Status of the taxonomy of *Leishmania* from the Mediterranean basin. *Parassitologia*, 26: 289-97.
- Gradoni, L., Scalone, A., Gramiccia, M.** (1993). HIV-*Leishmania* co-infections in Italy: serological data as an indication of the sequence of acquisition of the two infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87: 94-6.
- Gramiccia, M., Gradoni, L., Martino, L., Romano, R., Ercolini, D.** (1992). Two syntopic zymodemes of *Leishmania infantum* cause human and canine visceral leishmaniasis in the Naples area, Italy. *Acta Tropica*, 50: 357-359.
- Gramiccia, M., Gradoni, L.** (2005). The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, 35: 1169-80.
- Guerbouj, S., Victoir, K., Guizani, I., Seridi, N., Nuwayri-Salti, N., Belkaid, M., Ismail, R.B., Le Ray, D., Dujardin, J.C.** (2001). Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure? *Parasitology*, 122 Pt 1: 25-35.
- Guessous-Idrissi, N., Chiheb, S., Hamdani, A., Riyad, M., Bichichi, M., Hamdani, S., Krimech, A.** (1997). Cutaneous leishmaniasis: an emerging epidemic focus of *Leishmania tropica* in north Morocco. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91: 660-3.
- Hailu, A., Kroon, C.C., Schoone, G.J., Berhe, N., Schallig, H.D., Kager, P.A.** (2002). Sero-epidemiological assessment and diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic locality using Fast Agglutination Screening Test (FAST). *Acta Tropica*, 83: 93-101.
- Haralambous, C., Dakkak, A., Pratlong, F., Dedet, J.P., Soteriadou, K.** (2007). First detection and genetic typing of *Leishmania infantum* MON-24 in a dog from the Moroccan Mediterranean coast: genetic diversity of MON-24. *Acta Tropica*, 103: 69-79.
- Harith, A.E., Kolk, A.H., Kager, P.A., Leeuwenburg, J., Muigai, R., Kiugu, S., Laarman, J.J.** (1986). A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 583-36.

- Hide, M., Banuls, A.L., Tibayrenc, M.** (2001). Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. *Parasitology*, 123: 425-32.
- Houghton, R.L., Petrescu, M., Benson, D.R., Skeiky, Y.A., Scalone, A., Badaro, R., Reed, S.G., Gradoni, L.** (1998). A cloned antigen (recombinant K39) of *Leishmania chagasi* diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy. *Journal of Infectious Diseases*, 177: 1339-44.
- Howard, M.K., Sayers, G., Miles, M.A.** (1987). *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes: transformation *in vitro*, lectin agglutination, complement resistance, and infectivity. *Experimental Parasitology*, 64: 147-56.
- Inga, R., De Doncker, S., Gomez, J., Lopez, M., Garcia, R., Le Ray, D., Arevalo, J., Dujardin, J.C.** (1998). Relation between variation in copy number of ribosomal RNA encoding genes and size of harbouring chromosomes in *Leishmania* of subgenus *Viannia*. *Molecular Biochemical Parasitology*, 92: 219-28.
- Jamjoom, M.B., Ashford, R.W., Bates, P.A., Kemp, S.J., Noyes, H.A.** (2002). Polymorphic microsatellite repeats are not conserved between *Leishmania donovani* and *Leishmania major*. *Molecular Ecology Notes*, 2: 104-106.
- Jamjoom, M.B., Ashford, R.W., Bates, P.A., Kemp, S.J., Noyes, H.A.** (2002a). Towards a standard battery of microsatellite markers for the analysis of the *Leishmania donovani* complex. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 96: 265-70.
- Katakura, K., Kawazu, S., Naya, T., Nagakura, K., Ito, M., Aikawa, M., Qu, J.Q., Guan, L.R., Zuo, X.P., Chai, J.J., Chang, K.P., Matsumoto, Y.** (1998). Diagnosis of kala-azar by nested PCR based on amplification of the *Leishmania* mini-exon gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 2173-7.
- Kebede, A., De Doncker, S., Arevalo, J., Le Ray, D., Dujardin, J.C.** (1999). Size-polymorphism of mini-exon gene-bearing chromosomes among natural populations of *Leishmania*, subgenus *Viannia*. *International Journal for Parasitology*, 29: 549-57.
- Kelly, J.M., Law, J.M., Chapman, C.J., Van Eys, G.J., Evans, D.A.** (1991). Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Molecular Biochemical Parasitology*, 46: 253-63.
- Khiami, A., Dereure, J., Pratlong, F., Martini, A., Rioux, J.A.** (1991). Human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* MON-26 in the region of Damascus (Syria). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 84: 340-344.
- Killick-Kendrick, R.** (1990). The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 65 Suppl 1: 37-42.

- Killick-Kendrick, R., Rioux, J.A.** (2002). Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*. *Parassitologia*, 44: 67-71.
- Koehler, K., Stechele, M., Hetzel, U., Domingo, M., Schonian, G., Zahner, H., Burkhardt, E.** (2002). Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, 109: 9-17.
- Kohanteb, J., Ardehali, S.M., Rezai, H.R.** (1987). Detection of *Leishmania donovani* soluble antigen and antibody in the urine of visceral leishmaniasis patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 578-80.
- Koskinen, M.T., Hirvonen, H., Landry, P.A., Primmer, C.R.** (2004). The benefits of increasing the number of microsatellites utilized in genetic population studies: an empirical perspective. *Hereditas*, 141: 61-7.
- Kreutzer, R.D., Yemma, J.J., Grogl, M., Tesh, R.B., Martin, T.I.** (1994). Evidence of sexual reproduction in the protozoan parasite *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 51: 301-7.
- Kuhls, K., Mauricio, I.L., Pratlong, F., Presber, W., Schonian, G.** (2005). Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes and Infection*, 7: 1224-34.
- Kuhls, K., Keilonat, L., Ochsenreither, S., Schaar, M., Schweynoch, C., Presber, W., Schonian, G.** (2007). Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes and Infection*, 9: 334-43.
- Kuhls, K., Chicharro, C., Cañavate, C., Cortes, S., Campino, L., Haralambous, C., Soteriadou, K., Pratlong, F., Dedet, J.P., Maurício, I., Miles, M., Schaar, M., Ochsenreither, S., Radtke, O., Schönián, G.** (2008). Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1. *PLOS Neglected Diseases*, (em publicação).
- Kumar, R., Pai, K., Pathak, K., Sundar, S.** (2001). Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8: 1220-1224.
- Lambson, B., Smyth, A., Barker, D.C.** (2000). *Leishmania donovani*: development and characterisation of a kinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. *Experimental Parasitology*, 94: 15-22.
- Lambson, B., Barker, D.C.** (2002). Homologous minicircles in *Leishmania donovani*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96: S75-S80.

- Lee, S.T., Tarn, C., Chang, K.P.** (1993). Characterization of the switch of kinetoplast DNA minicircle dominance during development and reversion of drug resistance in *Leishmania*. *Molecular Biochemical Parasitology*, 58: 187-203.
- Lewin, S., Schonian, G., El Tai, N., Oskam, L., Bastien, P., Presber, W.** (2002). Strain typing in *Leishmania donovani* by using sequence-confirmed amplified region analysis. *International Journal for Parasitology*, 32: 1267-76.
- Lukes, J., Mauricio, I.L., Schönián, G., Dujardin, J.C., Soteriadou, K., Dedet, J.P., Kuhls, K., Tintaya, K.W., Jirků, M., Chocholová, E., Haralambous, C., Pratlong, F., Oborník, M., Horák, A., Ayala, F.J., Miles, M.A.** (2007). Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A.*, 104: 9375-9380.
- Lythgoe, K.A.** (2000). The coevolution of parasites with host-acquired immunity and the evolution of sex. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 54: 1142-56.
- Maazoun, R., Lanotte, G., Pasteur, N., Rioux, J.-A., Kennou, M.F., Pratlong, F.** (1981). Écologie des leishmanioses dans le Sud de la France. *Annales de Parasitologie*, 56: 131-146.
- Maia, C., Ramada, J., Cristovão, J.M., Goncalves, L., Campino, L.** (2007). Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal*, (doi:10.1016/j.tvjl.2007.08.009).
- Maia, C., Ramada, J., Cristovão, J.M., Gonçalves, L., Campino, L.** (2008). Importance of cats on zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 8: (em publicação).
- Manso, J. A., Dias, F. & Neto, E.** (1998). Leishmaníase cutânea localizada. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 29: 21-24.
- Mansueto, S., Leo, R.D., Miceli, M.D., Quartaro, P.** (1982). Canine leishmaniasis in three foci in Western Sicily. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76: 565-566.
- Maroli, M., Mizzon, V., Siragusa, C., D'Oorazi, A., Gradoni, L.** (2001). Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Medical and Veterinary Entomology*, 15: 358-63.
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglia, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M., Gradoni, L.** (2007). The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Tropical Medicine and International Health*, em publicação.

- Marty, P., Izri, A., Ozon, C., Haas, P., Rosenthal, E., Del Giudice, P., Godenir, J., Coulibaly, E., Gari-Toussaint, M., Delaunay, P., Ferrua, B., Haas, H., Pratlong, F., Le Fichoux, Y.** (2007) A century of leishmaniasis in Alpes-Maritimes, France. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 101: 563-74.
- Martin-Sanchez, J., Lopez-Lopez, M.C., Acedo-Sanchez, C., Castro-Fajardo, J.J., Pineda, J.A., Morillas-Marquez, F.** (2001). Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. *Parasitology*, 122: 607-615.
- Martin-Sanchez, J., Pineda, J.A., Andreu-Lopez, M., Delgado, J., Macias, J., De La Rosa, R., Morillas-Marquez, F.** (2002). The high sensitivity of a PCR-ELISA in the diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 96: 669-677.
- Martin-Sanchez, J., Gramiccia, M., Di Muccio, T., Ludovisi, A., Morillas-Marquez, F.** (2004). Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98: 228-32.
- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O., Morillas-Márquez, F.** (2007). Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. *Veterinary Parasitology*, 145: 267-273.
- Mathis, A., Deplazes, P.** (1995). PCR and In Vitro Cultivation for Detection of *Leishmania* spp. in Diagnostic Samples from Humans and Dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 1145-1149.
- Maurício, I., Campino, L., Abranches, P.** (1995). Quality control of the micro-ELISA technic applied to the diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Acta Médica Portuguesa*, 8: 607-11.
- Maurício, I.L., Howard, M.K., Stothard, J.R., Miles, M.A.** (1999). Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*, 119: 237-46.
- Maurício, I.L., Stothard, J.R., Miles, M.A.** (2000). The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, 16: 188-9.
- Maurício, I.L., Gaunt, M.W., Stothard, J.R., Miles, M.A.** (2001). Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitology*, 122: 393-403.
- Maurício, I.L., Stothard, J.R., Miles, M.A.** (2004). *Leishmania donovani* complex: genotyping with the ribosomal internal transcribed spacer and the mini-exon. *Parasitology*, 128: 263-7.
- Maurício, I.L., Yeo, M., Baghaei, M., Doto, D., Pratlong, F., Zemanova, E., Dedet, J.P., Lukes, J., Miles, M.A.** (2006). Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five

polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *International Journal for Parasitology*, 36: 757-69.

Maurício, I., Gaunt, M.W., Stothard, J.R., Miles, M.A. (2007). Glycoprotein 63 (gp63) genes show gene conversion and reveal the evolution of Old World *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*, 37: 565-576.

Medrano, F.J., Soriano, V., Calderon, E.J., Rey, C., Gutierrez, M., Bravo, R., Leal, M., Gonzalez-Lahoz, J., Lissen, E. (1997). Significance of indeterminate reactivity to human T-cell lymphotropic virus in western blot analysis of individuals at risk. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16: 249-52.

Meredith, S.E.O., Kroon, N.C.M., Sondorp, E., Seaman, J., Goris, M.G.A., Ingen, C.W., Oosting, H., Schoone, G.J., Terpstra, W.J., Oskan, L. (1993). Leish-KIT, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 1742-1745.

Minch, E., Ruiz-Linares, A., Goldstein, D., Feldman, M., Cavalli-Sforza, L.L. (1997). Microsat (version 1.5): A computer program for calculating various statistics on microsatellite allele data (Available at <http://lotka.stanford.edu/microsat>) computer program.

Minodier, P., Piarroux, R., Gambarelli, F., Joblet, C., Dumon, H. (1997). Rapid identification of causative species in patients with Old World leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 2551-2555.

Miró, G., Montoya, A., Mateo, M., Alonso, A., Garcia, S., Garcia, A., Caballero, M.J., Molina, R. (2007). A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006). *Parasitology Research*, 101: 253-7.

Mittal, V., Bhatia, R., Sehgal, S. (1991). Serodiagnosis of Indian kala-azar: evaluation of IFA, ELISA and CIEP tests. *The Journal of Communicable Diseases*, 23: 131-4.

Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., González, F., Castillo, J.A., Lucientes, J., Alvar, J. (1994). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88: 491-493.

Molyneux, D. & Killick-Kendrick, R. (1987). Morphology ultrastructure and life cycles. In "The leishmaniasis in biology and medicine". W. Peters & R. Killick-Kendrick (Eds.). Academic Press, London. 941 pp.

Morales, M.A., Cruz, I., Rubio, J.M., Chicharro, C., Canavate, C., Laguna, F., Alvar, J. (2002). Relapses versus reinfections in patients coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Infectious Diseases*, 185: 1533-7.

- Moreno, J., Alvar, J.** (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, 18: 399-405.
- Nei, M., Li, W.H.** (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76: 5269-5273.
- Neves, R., Cardoso, L.C., Afonso, O., Campino, L.** (2007). Leishmaniose canina em Portugal Continental- o que sabem os proprietários de cães acerca desta zoonose parasitária. *Veterinary Medicine*, 9: 47-53.
- Nicolas, L., Milon, G., Prina, E.** (2002). Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 51: 295-299.
- Nolder, D., Roncal, N., Davies, C.R., Llanos-Cuentas, A., Miles, M.A.** (2007). Multiple hybrid genotypes of *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of mucocutaneous Leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76: 573-8.
- Noyes, H., Reyburn, H., Bailey, J.W., Smith, D.** (1998). A Nested-PCR-Based Schizodeme Method for Identifying *Leishmania* Kinetoplast Minicircle Classes Directly from Clinical Samples and Its Application to the Study of the Epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 2877-2881.
- Nunes, M.** (2007). Aplicação de Técnicas de Biologia Molecular no Diagnóstico e Identificação de *Leishmania spp.* Susceptibilidade de *L. infantum* a Fármacos. *Tese Mestrado*. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, pp.115.
- Nuwayri-Salti, N., Baydoun, E., el-Tawk, R., Fakhoury Makki, R., Knio, K.** (2000). The epidemiology of leishmaniasis in Lebanon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94: 164-6.
- Ochsenreither, S., Kuhls, K., Schaar, M., Presber, W., Schonian, G.** (2006). Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 495-503.
- Oddo, F.G., Cascio, G.** (1963). The Immuno-Fluorescence Test in Visceral and Cutaneous Leishmaniasis. *Rivista dell'Istituto Sieroterapico Italiano*, 38: 139-45.
- Orti, G., Pearse, D.E., Avise, J.C.** (1997). Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94: 10745-9.
- Osman, O., Oskam, L., Zijlstra, E., Kroon, N., Schoone, G.J., Khalil, E., El-Hassan, A.M., Kager, P.** (1997). Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 2454-2457.

- Ouellette, M., Papadopoulou, B.** (1993). Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. *Parasitology Today*, 9: 150-3.
- Oura, C.A., Odongo, D.O., Lubega, G.W., Spooner, P.R., Tait, A., Bishop, R.P.** (2003). A panel of microsatellite and minisatellite markers for the characterisation of field isolates of *Theileria parva*. *International Journal for Parasitology*, 33: 1641-53.
- Papadopoulou, C., Kostoula, A., Dimitriou, D., Panagiou, A., Bobojianni, C., Antoniadis, G.** (2005). Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. *Journal of Infection*, 50: 53-60.
- Paradies, P., Capelli, G., Cafarchia, C., de Caprariis, D., Sasanelli, M., Otranto, D.** (2006). Incidences of canine leishmaniasis in an endemic area of southern Italy. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 53: 295-8.
- Paredes, R., Munoz, J., Diaz, I., Domingo, P., Gurgui, M., Clotet, B.** (2003). Leishmaniasis in HIV infection. *Journal of Postgraduate Medicine*, 49: 39-49.
- Pasteur, N., Pasteur, G., Bonhomme, F., Catalan, J., Briton-Davidian, J.** (1987). Manuel Technique de Génétique par Électrophorèse des Protéines. Paris.
- Piarroux, R., Azaiez, R., Lossi, A.M., Reynier, P., Muscatelli, F., Gambarelli, F., Fontes, M., Dumon, H., Quilici, M.** (1993). Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49: 364-9.
- Pinero, J., Martinez, E., Pacheco, R., Aragon, Z., De Armas, F., Del Castillo, A., Valladares, B.** (1999). PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, 73: 21-29.
- Pires, C.A., Santos-Gomes, G.M., Pratlong, F., Ribeiro, H., L., C., Abranches, P.** (1991). Phlébotomes du Portugal. IV. Infestation naturelle de Phlebotomus ariasi Tonnoir, 1921 par *Leishmania infantum* MON-24 dans le foyer de l'Alto-Douro. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 66: 47-48.
- Pires, C.A., Novo, M.T., Sousa, C.A.** (1992). Os flebótomos de Portugal. VII - Preferências hemáticas dos flebótomos (Diptera, Psychodidae) da região do Alto-Douro. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Entomologia*, 2 (Suppl 3): 607-613.
- Pirmez, C., Silva Trajano, V., Paes-Oliveira Neto, M., Cruz, A.M., Goncalves-Costa, S.C., Catanho, M., Degraive, W.M., Fernandes, O.** (1999). Use of PCR in Diagnosis of Human American Tegumentary Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1819-1823.
- Poli, A., Abramo, F., Barsotti, P., Leva, S., Gramiccia, M., Ludovisi, A., Mancianti, F.** (2002). Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Veterinary Parasitology*, 106: 181-91.

- Pratlong, F., Dedet, J.P., Marty, P., Portús, M., Deniau, M., Dereure, J., Abranches, P., Reynes, J., Martini, A., M., L., Rioux, J.-A.** (1995). *Leishmania*. Human immunodeficiency virus coinfection in the mediterranean bassin: Isoenzymatic characterization of 100 isolates of the *Leishmania infantum* complex. *The Journal of Infectious Diseases*, 172: 323-326.
- Pratlong, F., Dereure, J., Bucheton, B., El-Saf, S., Dessein, A., Lanotte, G., Dedet, J.P.** (2001). Sudan: the possible original focus of visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 122: 599-605.
- Pratlong, F., Rioux, J.A., Marty, P., Faraut-Gambarelli, F., Dereure, J., Lanotte, G., Dedet, J.P.** (2004). Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 4077-82.
- Quispe-Tintaya, K.W., Ying, X., Dedet, J.P., Rijal, S., De Bolle, X., Dujardin, J.C.** (2004). Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of cysteine proteinase B and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex. *Journal of Infectious Diseases*, 189: 1035-43.
- Quispe-Tintaya, K.W., Laurent, T., Decuypere, S., Hide, M., Banuls, A.L., De Doncker, S., Rijal, S., Canavate, C., Campino, L., Dujardin, J.C.** (2005). Fluorogenic assay for molecular typing of the *Leishmania donovani* complex: taxonomic and clinical applications. *Journal of Infectious Diseases*, 192: 685-92.
- Ramos, A., Farinhote, A.A.C.** (1952). Contribuição para o conhecimento do kala-azar em Portugal. *Anais do Instituto de Medicina Tropical*, 2: 1485-1500.
- Ravel, C., Cortes, S., Pratlong, F., Morio, F., Dedet, J.P., Campino, L.** (2006). First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *International Journal for Parasitology*, 36: 1383-8.
- Rebelo, M.E.** (1993). Nota prévia acerca de um lobo, *Canis lupus* L., 1758, infectado por *Leishmania* sp. em Portugal. *Veterinária Técnica*, 42.
- Reithinger, R., Coleman, P.G., Alexander, B., Vieira, E.P., Assis, G., Davies, C.R.** (2004). Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *International Journal for Parasitology*, 34: 55-62.
- Rioux, J.-A., Golvan, Y.J., Croset, H., Tour, S., Hoiun, R., Abonnenc, E., Petitdidier, M., Vollhardt, Y., Dedet, J.P., Albaret, J.L., Lanotte, G., Quillici, M. [eds.].** 1969. Épidémiologie des leishmanioses dans le Sud de la France. Ministère des Affaires Sociales, Paris.

- Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Perieres, J.** (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 65: 111-25.
- Rodrigues, E.H., Felinto de Brito, M.E., Mendonca, M.G., Werkhauser, R.P., Coutinho, E.M., Souza, W.V., Militao de Albuquerque, M.d.F., Jardim, M.L., Abath, F.G.** (2002). Evaluation of PCR for Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis in an Area of Endemicity in Northeastern Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 3572-3576.
- Rodriguez, N., De Lima, H., Rodriguez, A., Brewster, S., D.C., B.** (1997). Genomic DNA repeat from *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Vezuelan strain) containing simple repeats and microsatellites. *Parasitology*, 115: 349-358.
- Rolão, N., Cortes, S., Rodrigues, O.R., Campino, L.** (2004). Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of Parasitology*, 90: 1150-4.
- Rolão, N., Martins, M.J., João, A., Campino, L.** (2005). Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*, 12: 183-6.
- Rossi, V., Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Bastien, P.** (1994). Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. *Molecular Biochemical Parasitology*, 65: 271-82.
- Russell, R., Iribar, M.P., Lambson, B., Brewster, S., Blackwell, J.M., Dye, C., Ajioka, J.W.** (1999). Intra and inter-specific microsatellite variation in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. *Molecular Biochemical Parasitology*, 103: 71-7.
- Russo, R., Nigro, L., Panarello, G., Montineri, A.** (2003). Clinical survey of *Leishmania*/HIV co-infection in Catania, Italy: the impact of highly active antiretroviral therapy (HAART). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 97 Suppl 1: 149-55.
- Sadlová, J.** (1999). The life story of *Leishmania* (Kinetoplastidae). *Acta of the Society of Zoology of Bohemia*, 63: 331-366.
- Sah, S.P., Sharma, S.K., Rani, S.** (2002). Kala azar associated with malaria. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 126: 382-3.
- Salotra, P., Sreenivas, G., Ramesh, V., Sundar, S.** (2001). A simple and sensitive test for field diagnosis of post kala-azar dermal leishmaniasis. *Brazilian Journal of Dermatology*, 145: 630-2.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York.

- Sampaio-Silva, M.L., Campino, L., Avelino, I., Santos-Gomes, G.M., Seixas-Lopes, A.** (1993). Kala-azar em Portugal. VIII. Estudo epidemiológico da leishmaniose canina em três concelhos do Alto-Douro. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 16: 241-244.
- Sarkari, B., Chance, M., Hommel, M.** (2002). Antigenuria in visceral leishmaniasis: detection and partial characterisation of a carbohydrate antigen. *Acta Tropica*, 82: 339-48.
- Scalone, A., De Luna, R., Oliva, G., Baldi, L., Satta, G., Vesco, G., Mignone, W., Turilli, C., Mondesire, R.R., Simpson, D., Donoghue, A.R., Frank, G.R., Gradoni, L.** (2002). Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology*, 104: 275-85.
- Schallig, H.D., Oskam, L.** (2002). Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Tropical Medicine and International Health*, 7: 641-51.
- Schonian, G., Schweynoch, C., Zlateva, K., Oskam, L., Kroon, N., Graser, Y., Presber, W.** (1996). Identification and determination of the relationships of species and strains within the genus *Leishmania* using single primers in the polymerase chain reaction. *Molecular Biochemical Parasitology*, 77: 19-29.
- Schonian, G., Schnur, L., el Fari, M., Oskam, L., Kolesnikov, A.A., Sokolowska-Kohler, W., Presber, W.** (2001). Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95: 217-24.
- Schonian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H., Presber, W., Jaffe, C.L.** (2003). PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 47: 349-358.
- Schonian, G., Mauricio, I., Gramiccia, M., Canavate, C., Boelaert, M., Dujardin, J.C.** (2008). Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends in Parasitology*, 24: 135-42.
- Schoone, G.J., Van Eys, G.J.J.M., Ligthart, G.S., Taub, F.E., Zaal, J., Mebrahtu, Y., Laywer, P.** (1991). Detection and identification of *Leishmania* parasites by *in situ* hybridization with total and recombinant DNA probes. *Experimental Parasitology*, 73: 345-353.
- Schrey, C.F., Pires, C.A., Macvean, D.W.** (1989). Distribution of phlebotomine sandflies and the rate of their infection with *Leishmania* promastigotes in the Algarve, Portugal. *Medical and Veterinary Entomology*, 3: 125-30.

Schwenkenbecher, J.M., Wirth, T., Schnur, L.F., Jaffe, C.L., Schallig, H., Al-Jawabreh, A., Hamarsheh, O., Azmi, K., Pratlong, F., Schonian, G. (2004). Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica*. *International Journal for Parasitology*, 36: 237-46.

Semião-Santos, S.J., El Harith, A., Ferreira, E., Pires, C.A., Sousa, C., Gusmão, R. (1995). Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Parasitology Research*, 81: 235-239.

Shani-Adir, A., Kamil, S., Rozenman, D., Schwartz, E., Ramon, M., Zalman, L., Nasereddin, A., Jaffe, C.L., Ephros, M. (2005). *Leishmania tropica* in northern Israel: a clinical overview of an emerging focus. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53: 810-5.

Shaw, J. J. (2002). New World leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In "World Class Parasites" vol. 4, *Leishmania*. Farrell J. P. (Ed.), Kluwer Academic Publishers. Boston, Dordrech, London. 193 pp.

Sideris, V., Papadopoulou, G., Dotsika, E., Karagouni, E. (1999). Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *The European Journal of Epidemiology*, 15: 271-6.

Silva, E.S., Gontijo, C.M., Pirmez, C., Fernandes, O., Brazil, R.P. (2001). Short report: detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65: 896-898.

Simpson, L., Neckelmann, N., de la Cruz, V.F., Simpson, A.M., Feagin, J.E., Jasmer, D.P., Stuart, J.E. (1987). Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, 262: 6182-6196.

Singh, S., Gilman-Sachs, A., Chang, K.P., Reed, S.G. (1995). Diagnostic and prognostic value of K39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis. *Journal of Parasitology*, 81: 1000-3.

Singh, S., Sivakumar, R. (2003). Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *Journal of Postgraduate Medicine*, 49: 55-60.

Smyth, A.J., Ghosh, A., Hassan, M.Q., Basu, D., De Bruijn, M.H., Adhya, S., Mallik, K.K., Barker, D.C. (1992). Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*, 105: 183-192.

Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L. (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine

leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 560-3.

Solano-Gallego, L., Rodriguez-Cortes, A., Iniesta, L., Quintana, J., Pastor, J., Espada, Y., Portus, M., Alberola, J. (2007). Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76: 676-80.

Sollner-Webb, B. (1991). RNA editing. *Current Opinion in Cell Biology*, 3: 1056-61.

Spithill, T.W., Samaras, N. (1987). Genomic organization, chromosomal location and transcription of dispersed and repeated tubulin genes in *Leishmania major*. *Molecular Biochemical Parasitology*, 24: 23-37.

Sturm, N.R., Simpson, L. (1990). Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Cell*, 61: 879-84.

Sundar, S., Reed, S.G., Singh, V.P., Kumar, P.C., Murray, H.W. (1998). Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet*, 351: 563-5.

Sundar, S., Rai, M. (2002). Advances in the treatment of leishmaniasis. *Current Opinion on Infectious Diseases*, 15: 593-8.

Sundar, S., Maurya, R., Singh, R.K., Bharti, K., Chakravarty, J., Parekh, A., Rai, M., Kumar, K., Murray, H.W. (2006). Rapid, noninvasive diagnosis of visceral leishmaniasis in India: comparison of two immunochromatographic strip tests for detection of anti-K39 antibody. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 251-3.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.

Tavares, A. (1943). Leishmaníase cutânea autóctone. *Imprensa Médica*, 9: 129-131.

Tavares, C.A., Fernandes, A.P., Melo, M.N. (2003). Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 3: 657-667.

Tayeh, A., Jalouk, L., Cairncross, S. (1997). Twenty years of cutaneous leishmaniasis in Aleppo, Syria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91: 657-659.

Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Ayala, F.J. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proceedings of the Nationall Acad Sci U S A*, 87: 2414-8.

Tibayrenc, M., Ayala, F.J. (1999). Evolutionary genetics of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Microbes and Infection*, 1: 465-72.

- Tibayrenc, M., Ayala, F.J.** (2002). The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol*, 18: 405-10.
- Torrico, M.C., De Doncker, S., Arevalo, J., Le Ray, D., Dujardin, J.C.** (1999). In vitro promastigote fitness of putative *Leishmania (Viannia) braziliensis*/*Leishmania (Viannia) peruviana* hybrids. *Acta Tropica*, 72: 99-110.
- Toth, G., Gaspari, Z., Jurka, J.** (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10: 967-81.
- Van Eys, G.J., Schoone, G.J., Kroon, N.C., Ebeling, S.B.** (1992). Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular Biochemical Parasitology*, 51: 133-42.
- Victoir, K., Banuls, A.L., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., Hamers, R., Noel, S., De Doncker, S., Le Ray, D., Tibayrenc, M., Dujardin, J.C.** (1998). The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus *Viannia*. *Parasitology*, 117: 1-13.
- Victoir, K., Dujardin, J.C.** (2002). How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*. *Trends in Parasitology*, 18: 81-5.
- Volf, P., Benkova, I., Myskova, J., Sadlova, J., Campino, L., Ravel, C.** (2007). Increased transmission potential of *Leishmania major*/*Leishmania infantum* hybrids. *The International Journal for Parasitology*, 37: 589-93.
- WHO** (1990). Control of the Leishmaniases. World Health Organization, Geneva, 793: 158.
- WHO** (2000). *Leishmania*/HIV co-infection in south-western Europe 1990-1998: Retrospective analysis of 965 cases. Geneve, WHO/LEISH/2000.42:
- WHO** (2007). Report of the Fifth Consultative Meeting on *Leishmania*/HIV Coinfection. WHO, Addis Ababa, 30.
- Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Jauffret, Y., Dedet, J.P., Bastien, P.** (1996). The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Research*, 24: 1688-94.
- Youssef, M.Y., Eissa, M.M., el Mansoury, S.T.** (1997). Evidence of sexual reproduction in the protozoan parasite *Leishmania* of the Old World. *Journal of Egyptian Society of Parasitology*, 27: 651-7.
- Yurchenko, V.Y., Merzlyak, E.M., Kolesnikov, A.A., Martinkina, L.P., Vengerov, Y.Y.** (1999). Structure of *Leishmania* minicircle kinetoplast DNA classes. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1656-7.

Zakraoui, H., Ben Salah, A., Ftaiti, A., Marrakchi, H., Zaatour, A., Zaafour, B., Ahmadi, Z., Garraoui, A., Ben Osman, A., Dellagi, K., et al. (1995). Spontaneous course of lesions of *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Annales de Dermatologie et Venereologie*, 122: 405-7.

Zemanova, E., Jirku, M., Mauricio, I.L., Miles, M.A., Lukes, J. (2004). Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 7: 613-617.

APÊNDICES

Apêndice 1. Isolados portugueses humanos de *L. infantum* analisados neste estudo.

Amostra	Forma clínica	Estado imunitário	Região geográfica	Zimodeme (MON)	Observações
H1	LC	imunocompetente	Alto Douro	n.d.	
H2	LV	imunodeprimido	RML	1	
H3	LV	imunodeprimido	RML	n.d.	
H4	LV	imunodeprimido	RML	1	recidiva de H62
H5	LV	imunodeprimido	RML	1	
H6	LVC	imunodeprimido	RML	1	recidiva de H5
H7	LV	imunodeprimido	RML	<i>L. inf./L. maj.</i>	2ª recidiva de H5
H8	LV	imunodeprimido	RML	1	
H9	LVC	imunodeprimido	RML	1	recidiva de H8
H10	LV	imunodeprimido	RML	1	
H11	LV	imunodeprimido	RML	1	recidiva de H10
H12	LV	imunodeprimido	RML	1	
H13	LV	imunodeprimido	RML	1	recidiva de H12
H14	LV	imunodeprimido	RML	1	
H15	LV	imunodeprimido	RML	1	recidiva de H14
H16	LV	imunodeprimido	RML	1	
H17	LV	imunodeprimido	RML	1	recidiva de H16
H18	LV	imunocompetente	Alto Douro	n.d.	
H19	LV	imunocompetente	Alto Douro	1	
H20	LV	imunocompetente	Alentejo	variante	
H21	LV	imunodeprimido	RML	n.d.	
H22	LV	imunodeprimido	RML	1	recidiva de H21
H23	LV	imunodeprimido	RML	1	2ª recidiva de H21
H24	LV	imunodeprimido	RML	1	
H25	LV	imunodeprimido	RML	1	recidiva de H25
H26	LV	imunodeprimido	RML	1	
H27	LC	imunodeprimido	RML	1	
H28	LVC	imunodeprimido	Centro	1	
H29	LVC	imunodeprimido	RML	29	
H30	LVC	imunodeprimido	RML	29	recidiva de H30
H31	LC	imunocompetente	Alto Douro	1	
H32	LV	imunodeprimido	RML	24	
H33	LC	imunocompetente	Algarve	29	
H34	LV	imunodeprimido	RML	1	
H35	LV	imunodeprimido	RML	1	
H36	LV	imunodeprimido	RML	1	
H37	LV	imunodeprimido	RML	1	recidiva de H36

Apêndice 1 (continuação). Isolados portugueses humanos de *L. infantum* analisados neste estudo.

Amostra	Forma clínica	Estado imunitário	Região geográfica	Zimodeme (MON)	Observações
H38	LV	imunodeprimido	RML	1	
H39	LV	imunodeprimido	RML	1	
H40 [♦]	LV	imunodeprimido	RML	<i>L.inf./L.maj.</i>	recidiva de H36
H41	LC	imunocompetente	Alto Douro	n.d.	
H42	LV	imunocompetente	Alto Douro	1	
H43	LV	imunocompetente	Alto Douro	1	
H44	LV	imunocompetente	RML	1	
H45	LV	imunodeprimido	RML	1	
H46	LV	imunodeprimido	RML	1	
H47	LV	imunodeprimido	Centro	1	
H48	LV	imunocompetente	Alto Douro	1	
H49	LV	imunocompetente	Alto Douro	1	
H50	LV	imunodeprimido	RML	1	
H51	LV	imunodeprimido	Algarve	1	
H52	LV	imunodeprimido	Algarve	1	recidiva de H51
H53	LV	imunodeprimido	Algarve	1	2ª recidiva de H51
H54	LV	imunodeprimido	MRL	1	
H55	LV	imunodeprimido	MRL	1	
H56	LV	imunocompetente	Alto Douro	1	
H57	LC	imunocompetente	MRL	1	
H58	LV	imunocompetente	Alto Douro	1	
H59	LV	imunocompetente	Alto Douro	1	
H60	LV	imunocompetente	Alentejo	variante	
H61*	LC	imunocompetente	Alto Douro	n.d.	
H62*	LV	imunodeprimido	RML	1	
H63*	LV	imunodeprimido	RML	1	2ª recidiva de H62
H64*	LV	imunodeprimido	RML	1	
H65*	LV	imunodeprimido	Centro	1	

LV, leishmaniose visceral; LC, leishmaniose cutânea; LVC, leishmaniose viscero-cutânea;

RML, Região Metropolitana de Lisboa; n.d., não determinado;

L. inf./L. maj., híbrido *L. infantum* / *L. major*.

* apenas estudados por RFLP; [♦]apenas estudados por microssatélites

Apêndice 2. Isolados portugueses caninos de *L. infantum* analisados neste estudo.

Amostra	Região geográfica	Zimodeme (MON)
C1	RML	1
C2	RML	1
C3	RML	1
C4	RML	1
C5	RML	1
C6	RML	1
C7	RML	1
C8	RML	1
C9	RML	1
C10	RML	1
C11	RML	1
C12	RML	1
C13	RML	1
C14	RML	1
C15	RML	1
C16*	RML	1
C17	Algarve	1
C18	Alentejo	1
C19	RML	1
C20	RML	1
C21	RML	1
C22	RML	1
C23	RML	1
C24	RML	1
C25	RML	1
C26	RML	1
C27	RML	1
C28*	RML	1
C29	Alto Douro	1
C30	RML	1
C31	RML	1
C32	RML	1
C33	RML	1
C34*	Alto Douro	1
C35	RML	1
C36	Alentejo	1
C37	RML	1
C38	RML	1
C39	RML	1

Apêndice 2 (continuação). Isolados portugueses caninos de *L. infantum* analisados neste estudo.

Amostra	Região geográfica	Zimodeme (MON)
C40*	RML	1
C41*	RML	1
C42	RML	1
C43	RML	1
C44	RML	1
C45	RML	1
C46	RML	1
C47	Alto Douro	1
C48	Alentejo	1
C49	Alto Douro	1
C50	RML	1
C51	RML	1
C52	RML	1
C53	Alentejo	1
C54	Alentejo	1
C55	RML	1
C56	RML	1
C57	Alentejo	1
C58	RML	1
C59	RML	1
C60	RML	1
C61	RML	1
C62	RML	1
C63*	Alentejo	1

RML, Região Metropolitana de Lisboa.

* apenas estudados por RFLP

Apêndice 3. “Primers” MC1/MC2 utilizados para a amplificação da sequência parcial do minicírculo, a partir de uma sequência completa do minicírculo de DNA cinetoplastideal de *L. infantum* (nº de acesso “Genebank”: AF169140).

```

1  SGGGTTGGTG TAAAAATAGGG CCGGGTGGTG GCCGGAAATG GCTCCCCTGG GCTGGATTGG
61  GTTTTCCTGG GCTGGATTGG GCTGAAACCC TGGGGTTGGG GGCTTGGTTT TGGGTGGGCT
121 AGCGTTTTTG GTGTTTTAAT GGTTTCGGGTG CCTTTGATGT GGGTGTTGGT TGTGTGACTT
181 TAGTGGGTTG GAGCCTGGTG GAGGCTTG TG CCTTGGTGGG ATTAGTCTGG TGGGATGCTT
241 CGGGGTTACT CTACGGGTGT CTTTGATGAT GCTGGGTGGG TTGACTTTAA TGTGGGTTT
301 AGCCGATGGT GGTCTTGGT TGACCTTAGG TGGTGATTCT CTTTAATATT GATATTAAAG
361 GTAAGTGCTT GGACATATGA TATAGCCATA GCGCTTTAGA ATAGTTCGAC TCCGAAGACC
421 CGGTCTGAGG TAGTGTTAAG TGTACATTAA TCTAGTATAT AATTTAGCAT ATAATAACTG
481 ACATTACTCG TACACTATAA GTATTATGTT TAATATATTG CTGTAGTATG TATTTGTGTG
541 CTGTGTGTAG TAGTAATATC TATACCGATA TATTTATAGG TTGGCGCATA CTGCAGTGAA
601 TTGAAAATTA ATGAATTGGG GTCGGGCTGT GGGAAGGTGT CGTAAATTCT GGAAAATGAT
661 GGAAAATGGC CAAAATGGG GGGAAATTCC AAACTTTCT GGTCCTCCGG GTAGGGGCGT
721 TCTGCAAAAT CGGAAAAATG GGTGCAGAAA TCCCGTTCAA AAATCGACCA AAAATGCCAA
781 AAATCGGCTC CGGGGCGGGA AACTG

```

Região conservada do minicírculo a vermelho; “primers” a verde.